



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE LA PLATA

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS

Trabajo de Tesis realizado como requisito para optar al título de:

DOCTORA EN CIENCIAS VETERINARIAS

Evaluación de los efectos de la endogamia en la calidad seminal
bovina mediante el análisis de bloques de homocigosidad y
estudios de asociación de genoma completo

AUTORA: TERAN, Ester Mercedes

DIRECTOR: DEMYDA-PEYRÁS, Sebastián.

CODIRECTOR: GOSZCZYNSKI, Daniel Estanislao.

LUGAR/ES DE TRABAJO: Instituto de Genética Veterinaria Ing. Fernando Noel Dulout (IGEVET)

Cátedra de Genética de Poblaciones y Mejoramiento Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias-
Universidad Nacional de La Plata

MIEMBROS DEL JURADO:

CORVA, Pablo

FORNERIS, Natalia

MOLINA, Antonio

2024

Agradecimientos

Me gustaría agradecer a todas las instituciones y personas que colaboraron en el desarrollo de esta tesis. Fue un trabajo de varios años en el cual intervinieron y brindaron su apoyo incondicional para darle forma a este trabajo que sin ellos no hubiese sido posible.

En primer lugar, quisiera mencionar a las instituciones y sus representantes que participaron en la ejecución de este trabajo. A CONICET por otorgarme una beca que me permitió financiar mis estudios de doctorado. A IGEVET y Facultad de Ciencias Veterinarias porque fue el lugar donde pude iniciar y finalizar las tareas de doctorado. Seguidamente quisiera mencionar a las personas que colaboraron directamente con la realización de esta tesis. A mi director, gracias por asesorarme durante todos estos años, por guiarme en el camino de un doctorando y darme las herramientas para trabajar con otros grupos y diversificar mis experiencias de investigación. A mi codirector por las correcciones de la tesis, sus aportes fueron significativos en la escritura de esta tesis. Gracias a mis compañeros y amigos becarios, quienes se transformaron en mi familia platense e hicieron que la experiencia de doctorado fuese más enriquecedora, y sobre todo gracias por apoyarme en todas las situaciones laborales y extra laborales. Gracias a mis amigas de La Plata que me adoptaron como una platense más y siempre fueron incondicionales.

También quisiera agradecer a las personas que, aunque no estuvieron directamente ligadas a mi doctorado, colaboraron desinteresadamente para que se concrete este trabajo. A Mónica que siempre tuvo buena predisposición en el laboratorio, gracias por la paciencia y la enseñanza. Al grupo MERAGEM y al grupo de IRAC, quienes me permitieron llevar a cabo una parte experimental del doctorado y colaboraron en todo lo posible para que pueda llevar a cabo mis experimentos.

Por otro lado, fueron varias las personas con las que compartí el trabajo diario de laboratorio y siempre fueron muy cordiales. Al personal del IGEVET, a Pilar y Guillermo por permitirme realizar mis tareas en la institución, a la cátedra de genética de poblaciones y mejoramiento animal, quienes fueron parte de mi formación docente y con quienes compartí mi lugar de trabajo y muchas experiencias.

Por supuesto, también quiero agradecer a mi familia y amigos fuera de la institución quienes me dieron apoyo incondicional y siempre estuvieron presentes aun a la distancia. Fueron mi motor e inspiración para nunca bajar los brazos.

Por último, pero no menos importante quiero agradecer a mis compañeros del IMIBIO quienes además de darme una cálida bienvenida, siempre fueron muy atentos conmigo. Gracias por el apoyo en los últimos pasos de la tesis.

Citas bibliográficas correspondientes a las publicaciones parciales del trabajo de tesis

Publicaciones en revistas científicas

1. D. Goszczynski, A. Molina, **E. Teran**, H. Morales-Durand, P. Ross, H. Cheng, G. Giovambattista, S. Demyda-Peyrás. Runs of homozygosity in a selected cattle population with extremely inbred bulls: Descriptive and functional analyses revealed highly variable patterns. PLOS ONE. 2018; 13(7): e0200069. DOI: 10.1371/journal.pone.0200069.
2. **E. Teran**, F. Azcona, M. Ramón, A. Molina, J. Dorado, M. Hidalgo, P. Ross, D. Goszczynski, S. Demyda-Peyrás. Sperm morphometry is affected by increased inbreeding in the Retinta cattle breed: A molecular approach. Molecular Reproduction and Development. 2021; 1–11. DOI: 10.1002/mrd.23475.

Presentaciones a congresos nacionales e internacionales

1. **E. Teran**, D. Goszczynski, A. Molina, P. Ross, J. Dorado, G. Giovambattista, S. Demyda Peyrás. Runs of homozygosity analysis and their possible influence in the sperm motility in highly consanguineous bulls. 44th IETS Annual Conference. Resumen 150. Reproduction, Fertility and Development 2017; 30, 215-215. DOI: 10.1071/RDv30n1Ab150.
2. **E. Teran**, D. Goszczynski, A. Molina, S. Demyda Peyrás. Estudio de bloques de homocigosidad en toros Retintos de alta y baja endogamia. II Congreso de Veterinaria y Ciencia y Tecnología de los alimentos, 2018. Resumen. Córdoba, España.
3. F. Azcona; M. Solé, J. Dorado, P. Ross, **E. Teran**, S. Demyda Peyrás. Whole genome association analysis suggests an influence of inbreeding on bull sperm morphometry. 45th

Annual Conference of the International Embryo Technology Society. Resumen 155. *Reproduction, Fertility and Development* 2018; 31(1) 202-203. DOI: 10.1071/RDv31n1Ab155.

4. **E. Teran**, F. Azcona, J. Dorado, M. Ramón, A. Molina, S. Demyda-Peyrás. Estudio preliminar de longevidad espermática en toros Retintos caracterizados por niveles divergentes de endogamia. 13° Simposio Internacional de Reproducción Animal, 2019. Resumen 267. Córdoba, Argentina.
5. **E. Teran**, A. Molina, Z. Peña Rodriguez, J. Dorado, S. Demyda Peyrás. The evolution of kinetic sperm subpopulations and premature hyperactivation is affected by inbreeding level in Retinta cattle. 47th Annual Conference of the IETS. Resumen 100. *Reproduction, Fertility and Development* 2021; 33(2) 157-157.
6. **E. Teran.**, R. Morales, A. Molina, S. Demyda Peyrás. Estudio de asociación de genoma completo para un ensayo de longevidad espermática en toros. XVIII Congreso Latinoamericano de Genética. LIV Reunión Anual de la Sociedad de Genética de Chile. XLIX Congreso Argentino de Genética. VIII Congreso de la Sociedad Uruguaya de Genética. I Congreso Paraguayo de Genética. V Congreso Latinoamericano de Genética Humana. Resumen GGM 35. *Journal of Basic and Applied Genetics I Vol XXXII Suppl.* 2021; (1): 192-215. DOI: 10.35407/bag.2021.32.01.suppl.15.
7. **E. Teran**, A. Molina, M. Ramon, R. Morales, Y. Pirosanto, Z. Peña Rodriguez, S. Demyda-Peyrás. Sperm motility subpopulations are correlated with fertility in Retinta Bulls. 48th Annual Conference of the IETS. Resumen 115. Savannah, Estados Unidos. *Reproduction, Fertility, and Development* 2022. 34(2), 294–295. DOI: 10.1071/RDv34n2Ab115.

8. **E. Teran**, Y. Piroberto, F. Azcona, A. Molina, P. Tríbulo, A. Cesari, S. Demyda-Peyrás. Effect of the individual inbreeding values on the sperm motility patterns in Angus cattle. 19th International Congress on Animal Reproduction, 2022. Resumen W145. Bologna, Italia.
9. **E. Teran**, Y. Piroberto, P. Tribulo, M. Ramon, A. Antonini, A. Molina, S. Demyda-Peyrás. Sperm kinetic subpopulations in samples from Angus and Holstein bulls vary differentially in a longitudinal assay. 49th Annual Conference of the IETS, 2023. Resumen 87315, Lima, Perú. *Reproduction, Fertility and Development* 35(2) 142-143. DOI: 10.1071/RDv35n2Ab34.
10. **E. Teran**, R. Morales-Cid, A. Molina, S Demyda Peyrás. Variations in sperm kinematic parameters over time is associated with specific genomic regions in Retinta beef cattle. The 11th International Ruminant Reproduction Symposium, 2023. Resumen 65, Galway, Irlanda.

ÍNDICE

<i>Agradecimientos</i> _____	<i>I</i>
<i>Citas bibliográficas correspondientes a las publicaciones parciales del trabajo de tesis</i> _____	<i>III</i>
<i>Abreviaturas y símbolos</i> _____	<i>IX</i>
<i>Resumen</i> _____	<i>X</i>
<i>Abstract</i> _____	<i>XII</i>
<i>INTRODUCCIÓN</i> _____	<i>1</i>
Endogamia en bovinos y depresión endogámica _____	<i>2</i>
¿Qué es la depresión endogámica? _____	<i>2</i>
Estimación de la endogamia a nivel individual _____	<i>4</i>
Bloques de homocigosidad y otros métodos moleculares para estimar el nivel de endogamia _____	<i>6</i>
Calidad espermática como medida de fertilidad _____	<i>10</i>
Análisis automatizado de la calidad espermática _____	<i>11</i>
Morfometría espermática _____	<i>13</i>
Motilidad espermática _____	<i>15</i>
Longevidad espermática _____	<i>17</i>
Estudios de asociación de genoma completo _____	<i>18</i>
Razas utilizadas en este trabajo _____	<i>19</i>
Justificación _____	<i>21</i>
<i>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</i> _____	<i>23</i>
Hipótesis _____	<i>24</i>
Objetivos generales _____	<i>24</i>
Objetivos específicos _____	<i>24</i>
<i>CAPÍTULO 1</i> _____	<i>25</i>

Estudio de bloques de homocigosidad en una población bovina seleccionada de toros altamente endogámicos: Un análisis descriptivo y funcional revela patrones altamente variables	26
Introducción	26
Materiales y métodos	31
Resultados	35
Discusión	- 51 -
Conclusión	- 58 -
CAPÍTULO 2	- 60 -
La morfometría espermática es afectada por el aumento de la consanguinidad en la raza bovina Retinta: un enfoque molecular	- 61 -
Introducción	- 61 -
Materiales y métodos	- 64 -
Resultados	- 70 -
Discusión	- 75 -
Conclusión	- 81 -
CAPÍTULO 3	- 82 -
Estudio del efecto de la endogamia molecular en el patrón de subpoblaciones espermáticas motiles en tres razas bovinas	- 83 -
Introducción	- 83 -
Materiales y métodos	- 87 -
Resultados	- 93 -
Discusión	- 105 -
Conclusión	- 111 -
CAPÍTULO 4	- 112 -
Estudio del efecto de la endogamia en la variación de parámetros cinemáticos en el tiempo en toros Retinta	- 113 -
Introducción	- 113 -
Materiales y métodos	- 115 -
Resultados	- 119 -
Discusión	- 125 -
Conclusión	- 128 -
CAPÍTULO 5	- 130 -
Estudio preliminar de las regiones genómicas asociadas con la variación de los parámetros cinemáticos en el tiempo en toros Retinta.	- 131 -

Introducción _____	- 131 -
Materiales y métodos _____	- 132 -
Resultados _____	- 134 -
Discusión _____	139
Conclusión _____	143
<i>DISCUSIÓN GENERAL</i> _____	144
Endogamia _____	145
Evaluación molecular de la consanguinidad _____	146
Distribución de ROH _____	148
Potencial aplicación en Argentina _____	151
La calidad espermática como medida de fertilidad _____	152
Depresión endogámica _____	154
Depresión endogámica a nivel cromosómico y por longitud _____	156
Efecto de la endogamia en la hiperactivación temprana _____	158
Evaluación genómica de los mecanismos asociados al movimiento espermático en el tiempo _____	160
<i>CONCLUSIONES</i> _____	162
<i>Bibliografía general</i> _____	165
<i>Material suplementario</i> _____	186
Material suplementario del capítulo 1 _____	187
Material suplementario del capítulo 2 _____	192
Material suplementario del capítulo 3 _____	- 198 -
Material suplementario del capítulo 4 _____	- 201 -

Abreviaturas y símbolos

SNP: *Single Nucleotide Polymorphism*

ROH: *Runs of Homozygosity*

ROHi: *ROH island*

CASA: *Computer-assisted sperm analysis*

AE: grupo de alta endogamia ($F > 0,125$)

BE: grupo de baja endogamia ($F \leq 0,125$)

IBD: *Identical by descent*

HBD: *Homozygous by descent*

F_{PED} : Coeficiente de endogamia calculado a partir de pedigrí

F_{ROH} : Coeficiente de endogamia calculado a partir de ROH

F_{MIC} : Coeficiente de endogamia calculado a partir de microsatélites

F_{HBD} : Coeficiente de endogamia calculado a partir de HBD

GWAS: *Genome-wide association study*

VCL: Velocidad curvilínea

VSL: Velocidad en línea recta

VAP: Velocidad promedio de la trayectoria

LIN: linealidad

STR: rectitud

WOB: oscilación

ALH: amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza

BCF: frecuencia del cruce de la cabeza con respecto a su trayectoria promedio

Evaluación de los efectos de la endogamia en la calidad seminal bovina mediante el análisis de bloques de homocigosidad, y estudios de asociación de genoma completo

Palabras clave: consanguinidad, bovinos, ROH, calidad espermática, hiperactivación

Resumen

La endogamia puede definirse como el apareamiento entre individuos emparentados. Su aumento puede provocar depresión endogámica, que es la disminución de la media fenotípica poblacional de varios caracteres, principalmente los reproductivos. En los últimos años, la utilización de información genómica ha permitido estimar de forma más precisa el nivel de endogamia, mediante la identificación de segmentos homocigotos (*runs of homozygosity*, ROH) y, en base a ellos poder calcular un coeficiente de endogamia molecular (F_{ROH}).

En esta tesis se caracterizó la abundancia y distribución de ROH en tres poblaciones bovinas, encontrándose variabilidad, y acumulación de ROH en ciertas regiones en dos razas, las cuales se asociaron con procesos de selección. Particularmente, se observó variabilidad de ROH entre individuos con similares coeficientes de endogamia basados en pedigrí. Además, se evaluó el efecto de la endogamia molecular global, cromosómica y por longitud, sobre la morfometría, motilidad y longevidad espermática, así como las regiones genómicas enriquecidas en ROH asociadas a dichos caracteres. Se encontró que una endogamia mayor a 0,125 provocaba un incremento de espermatozoides pequeños y alargados, y una hiperactivación temprana, la cual podría limitar la longevidad espermática. Las regiones significativamente enriquecidas en ROH incluyeron genes asociados con la espermatogénesis, motilidad, fisiología espermática y el desarrollo embrionario. Se evidenciaron diferentes niveles de depresión endogámica entre los distintos cromosomas, y un mayor efecto debido a ROH largos, originados recientemente. Finalmente, una combinación de ROH y análisis de asociación permitió identificar genes

potencialmente involucrados en la longevidad espermática. En conclusión, el uso de F_{ROH} es más fiable e informativo que el F basado en pedigrí, y complementado con el análisis funcional es una metodología innovadora para el análisis de depresión endogámica en caracteres productivos. Esta tesis contribuye a aumentar el conocimiento sobre los efectos de la endogamia molecular en la calidad espermática del bovino.

Evaluation of the effects of inbreeding on bovine sperm quality by analysing runs of
homozygosity and genome-wide association studies

Keywords: inbreeding, bovine, ROH, sperm quality, hyperactivation

Abstract

Inbreeding is defined as mating between related individuals. An increase in inbreeding can result in inbreeding depression, which is a decrease in the population phenotypic mean of several traits, mainly the reproductive ones. The use of genomic information has made it possible to estimate more precisely the inbreeding level by identifying homozygous segments (runs of homozygosity, ROH) and, from these, to estimate a molecular inbreeding coefficient (F_{ROH}).

In this thesis, the abundance and distribution of ROH in three cattle populations were examined, finding variability and accumulation of ROH in specific regions in two breeds, which were associated with selection. In particular, ROH variability was observed among individuals with similar pedigree-based inbreeding coefficients. Moreover, the effect of global, chromosomal and length-based molecular inbreeding on sperm morphometry, motility and longevity was evaluated, as well as the genomic regions enriched in ROH associated with these traits. Inbreeding level higher than 0.125 resulted in an increase in small, elongated spermatozoa and early hyperactivation, which could limit the sperm longevity and thus compromise fertility. Genomic regions significantly enriched in ROH included genes associated with spermatogenesis, motility, sperm physiology and embryonic development. Differences in the level of inbreeding depression were observed between chromosomes, showing a larger effect due to long, recently originated ROH. Finally, a combination of ROH and association analysis allowed the identification of genes potentially involved in sperm longevity. In conclusion, the F_{ROH} approach is more reliable and

informative than pedigree-based F , and combined with functional analysis it is an innovative methodology for the study of inbreeding depression in productive traits. This thesis contributes to increase the knowledge on effects of molecular inbreeding on sperm quality in cattle.

INTRODUCCIÓN

Endogamia en bovinos y depresión endogámica

Los programas de selección y mejora han logrado un gran avance en el área de producción debido al uso de metodologías que permiten una estimación más precisa de los valores esperados de progenie de diferentes caracteres de interés productivo. En los últimos años, este progreso se ha visto acelerado por el uso de tecnologías de reproducción asistida y de secuenciación genómica que han contribuido al aumento de su eficiencia y dispersión a nivel mundial. Sin embargo, el incremento de la intensidad de selección de animales con alto valor genético para uno o varios caracteres productivos ha resultado en la disminución del tamaño efectivo de las poblaciones empleadas en los sistemas productivos, principalmente debido al aumento en la frecuencia de cruzamientos de animales emparentados (de Roos y col., 2011). Este proceso ha provocado la homogenización de las poblaciones con la consecuente disminución de la diversidad genética, aumento de la consanguinidad y la aparición de problemas de depresión por endogamia.

¿Qué es la depresión endogámica?

La depresión por endogamia es la reducción de la aptitud biológica media de una población debida al aumento del nivel de endogamia (Falconer y Mackay, 1996). Este proceso ha sido detectado en diferentes caracteres, como la producción de leche (Miglior y col., 1992; Doekes y col., 2019), peso y crecimiento (Pereira y col., 2016; Forneris y col., 2021) y longevidad (Sewalem y col., 2006), así como calidad espermática (Dorado y col., 2015), y fertilidad de las hembras (Laseca y col., 2022), entre otros.

Existen tres mecanismos genéticos que han sido propuestos para explicar la depresión endogámica (Kristensen y Sørensen, 2007). El primero y más difundido es el de la dominancia parcial, donde la disminución de la media fenotípica se produce como consecuencia de la

expresión de alelos recesivos deletéreos en homocigosis (Charlesworth y Willis, 2009). El segundo mecanismo es la sobredominancia, que hace hincapié en la superioridad del genotipo heterocigota con respecto a ambos homocigotas. Por último, el tercer mecanismo está ligado a la epistasis (mecanismo menos conocido y estudiado), el cual se basa en la disrupción de combinaciones de alelos de distintos genes que interactúan de manera positiva (Charlesworth, 1998; Leroy, 2014).

Entre otras teorías, se ha propuesto que la depresión endogámica por dominancia parcial o sobredominancia tendría una relación lineal con el nivel de endogamia (Croquet y col., 2007), mientras que la depresión endogámica por epistasis produciría un efecto no lineal (Lynch, 1991). Aunque estas premisas fueron ampliamente aceptadas, los estudios que se llevaron a cabo para validarlas son contradictorios. Algunos autores encontraron una relación lineal entre el coeficiente de endogamia individual y la depresión endogámica (Smith y col., 1998; Biffani y col., 2002; Carolino y Gama, 2008; Bjelland y col., 2013), mientras que otros no la encontraron o solo la encontraron en rangos bajos de endogamia, sugiriendo una relación no lineal para valores de endogamia altos (Croquet y col., 2007). Esta falta de concordancia puede deberse a diferentes factores como por ejemplo, la falta de individuos con altos niveles de endogamia (Maximini y col., 2011), la utilización de diferentes rangos de endogamia o incluso la utilización de coeficientes de consanguinidad con diferente cantidad de ancestros conocidos (Cassell y col., 2003). A su vez, la influencia de factores externos, como el estrés, puede agravar, en mayor o menor medida, la magnitud de depresión fenotípica observada (Kristensen y col., 2003).

Debido a estas inconsistencias sobre la linealidad de los efectos de la depresión endogamia, algunos estudios se han enfocado en analizar el coeficiente de endogamia como variable categórica, definiendo un umbral a partir del cual los efectos de la endogamia serían más perjudiciales. Por ejemplo, Parland y col. (2007) encontraron que aunque la producción de leche

se encontraba disminuida en animales que presentaban un nivel de endogamia entre 6,25% y 12,5%, la magnitud del efecto era mayor en animales con niveles de endogamia superiores a 12,5%, mientras que los animales con niveles de endogamia menores a 6,25% no manifestaban efectos perjudiciales en dicho carácter. En el mismo sentido, Sewalem y col. (2006) asociaron niveles de endogamia mayores a 12,5% con una disminución en la longevidad. Además, este efecto era mayor en animales con un nivel de endogamia superior a 25% en comparación con categorías de endogamia menor a 12,5%.

Estimación de la endogamia a nivel individual

La endogamia puede ser estimada mediante la utilización de un coeficiente teórico, que representa la probabilidad de que los dos alelos presentes en un locus en un individuo sean idénticos por descendencia, es decir, provengan por vía materna y paterna de un antecesor común (Falconer y Mackay, 1996). Este coeficiente de endogamia, denominado F_{PED} , es analizado a partir de la información de pedigrí y su cálculo se basa en la teoría propuesta por Wright (1922), basada en el número de generaciones que separan a los dos individuos que están apareándose de su ancestro común:

$$F_X = \sum \left(\frac{1}{2}\right)^{n+n'+1} \times (1 + F_A)$$

donde, F_X = coeficiente de consanguinidad del individuo x, n y n' =número de generaciones desde cada progenitor al antecesor común, y F_A = coeficiente de endogamia del antecesor en común. Luego Malécot (1948) redefinió el concepto como la probabilidad de que dos alelos elegidos al azar en un locus homólogo dentro de un individuo sean idénticos por descendencia con respecto a una población base (de referencia) en la que todos los alelos son independientes. Los locus idénticos por descendencia se denominan autocigotos, a diferencia de los alocigotos que son

idénticos por estado, los cuales, a pesar de ser idénticos, no son heredados de un antepasado común.

El cálculo del coeficiente de endogamia a partir de pedigrí es sencillo, pero su fiabilidad depende en gran medida de la disponibilidad, fidelidad y profundidad de los registros genealógicos de la población. Por tal motivo, este coeficiente cuenta con varias limitaciones, tales como el correcto registro de la información genealógica, ya que al tratarse de un registro que involucra varias generaciones puede haber información faltante o incluso incompatibilidades por mala asignación de los progenitores. Pero, además, es ampliamente conocido el efecto que produce la profundidad del pedigrí, es decir la cantidad de generaciones registradas y a partir de las cuales se va a realizar el cálculo, en la precisión de las estimaciones. Este factor es muy condicionante, ya que las generaciones de las cuales no se cuenta con información, son consideradas no relacionadas y, por lo tanto, mientras menor sea el número de generaciones conocidas, mayor será la probabilidad de subestimar el valor de F_{PED} (Keller y col., 2011). Finalmente, al tratarse de un coeficiente teórico, no tiene en cuenta el muestreo mendeliano ni desequilibrio de ligamiento que puede desviar las proporciones teóricas esperadas (Weir y col., 1980; Hill y Weir, 2011).

Desde el punto de vista molecular, el valor de endogamia también puede ser estimado en base a la determinación de las variantes alélicas existentes en un individuo utilizando diversas técnicas. Originalmente, se emplearon marcadores moleculares de tipo microsatélites para calcular el coeficiente de consanguinidad mediante la obtención de coeficientes de auto-parentesco, utilizando la definición de parentesco de Malécot (1948). Estos coeficientes resultan útiles para estudiar la diversidad genética en programas de conservación (Caballero y Toro, 2002) y estructuración poblacional en animales domésticos (Corva y col., 2015). Sin embargo, su

fiabilidad para determinar el nivel de consanguinidad individual ha sido cuestionada, principalmente debido al limitado número de marcadores utilizados (10-20) y al método utilizado, el cual mide el exceso de homocigosis en base a heterocigosis esperada y observada. En este sentido, Balloux y col. (2004) sugirieron un número mínimo de 200 marcadores para poder obtener datos fiables y cuestionaron la relación entre heterocigosis y coeficiente de consanguinidad obtenido utilizando este tipo de información. Del mismo modo, Carothers y col. (2006) indicaron que las estimaciones de coeficientes de endogamia individuales obtenidas a partir de microsatélites son poco fiables, principalmente debido a la falta de relación directa entre el exceso de homocigosis de unos pocos marcadores y la endogamia total de un individuo.

Bloques de homocigosidad y otros métodos moleculares para estimar el nivel de endogamia

El advenimiento de la era genómica, que trajo aparejado el genotipado masivo de los animales mediante chips de marcadores SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*) ha hecho posible la utilización de esta información para obtener estimadores del nivel de endogamia individual más fiables (Kristensen y col., 2010). Su principal ventaja radica en la cantidad de marcadores analizados por individuo (en bovino se encuentran chips de SNP de una densidad mínima de 7.000 y máxima de 700.000 marcadores), que a su vez están distribuidos homogéneamente a lo largo de su genoma (Silió y col., 2013; Zhang y col., 2015; Mastrangelo y col., 2016).

En la actualidad existen varios métodos para estimar el nivel de consanguinidad genómico a partir de SNPs. Uno de ellos, denominado F_{HOM} , se basa en el cálculo de exceso de marcadores en estado homocigota (Wright, 1948), comparando la homocigosidad observada con la esperada. Aunque este enfoque es sencillo de interpretar, presenta algunas falencias, como la falta de consideración del mapa genómico y el desequilibrio de ligamiento. A su vez, es dependiente de

las frecuencias alélicas de la población de referencia, lo cual puede sesgar los resultados (Zhang y col., 2015).

Utilizando un método más complejo, se estima el coeficiente F_{GRM} , el cual se obtiene a partir de la matriz de relaciones genómicas de VanRaden (VanRaden, 2008), que contiene las similitudes genómicas para todos los pares de individuos. Los F_{GRM} son estimados como la relación genómica de un individuo consigo mismo, estimada a partir de los datos de SNPs, bajo las suposiciones de equilibrio de Hardy-Weinberg y ausencia de endogamia.

Sin embargo, el enfoque más actual es aquel que se basa en la estimación de bloques o segmentos en homocigosis, denominados ROH (*Runs of Homozygosity*). Estos bloques se definen como segmentos genómicos de una longitud mínima determinada que se encuentran en estado homocigoto y son heredados como haplotipos idénticos por descendencia (Gibson y col., 2006). Los ROH se pueden determinar por métodos observacionales o basados en modelos estadísticos. Entre los primeros se puede mencionar el método de “ventana deslizante”, el cual es actualmente el más utilizado, y se basa en escanear cada cromosoma moviendo una ventana de tamaño fijo en busca de segmentos de SNP's homocigotos consecutivos, estableciendo parámetros como el número mínimo de SNP's en homocigosis y la cantidad de SNP's heterocigotos y ausentes permitidos en el fragmento. Un método similar, implementado en R con la función *consecutive.runs* (Marras y col., 2015), escanea el genoma de manera continua, pero en lugar de utilizar ventanas, detecta la presencia de marcadores consecutivos en homocigosis hasta que se infrinjan alguno de los parámetros definidos inicialmente. Finalmente, existen métodos probabilísticos avanzados, basados en modelos ocultos de Markov, los cuales tienen en cuenta las frecuencias alélicas existentes en la población y los errores de genotipado para determinar la probabilidad de que un genotipo de un marcador SNP sea homocigoto por estado o descendencia. Estos métodos se consideran más fiables, ya que son menos dependientes de los parámetros que

definen a un ROH, los cuales carecen actualmente de una estandarización entre especies, y plataformas de genotipado, lo que puede producir diferencias entre las estimaciones. Sin embargo, existe una desventaja en el uso de métodos probabilísticos y se debe principalmente a los elevados requerimientos en capacidad de procesamiento, sobre todo cuando se analizan poblaciones grandes (Druet y Gautier, 2017).

Independientemente del método de detección de ROH utilizado, el coeficiente de endogamia obtenido a partir de ROH (F_{ROH}) se estima como la proporción de los marcadores moleculares analizados en el genoma de un individuo que se encuentran dentro de algún ROH con respecto al largo total del genoma. Actualmente, este coeficiente de endogamia es el más preciso, probablemente debido a que a que tiene en cuenta el error de muestreo mendeliano y el desequilibrio de ligamiento existente en una población, lo cual es ignorado por otros métodos basados en información molecular (Curik y col., 2014).

Una de las ventajas de la utilización de ROH para determinar el nivel de consanguinidad es que permite identificar las regiones y/o genes en los cuales los niveles de homocigosis están significativamente aumentados (Mastrangelo y col., 2018). En este sentido, se descubrió que existen zonas más propensas a acumular ROH debido a un alto desequilibrio de ligamiento y baja tasa de recombinación (Gibson y col., 2006), las cuales han sido denominadas “*ROH hotspot*” o “*ROH islands*”. Actualmente, estas zonas del genoma están siendo utilizadas para diversos estudios genómicos, entre los que se encuentran la detección de huellas de selección (Szmatoła y col., 2016; Peripolli y col., 2018) y/o la identificación de aquellas regiones más propensas a producir depresión por endogamia (Laseca y col., 2022).

Además, la longitud de los fragmentos ROH analizados se puede asociar con el número de generaciones transcurridas desde el cruzamiento endogámico de acuerdo a la teoría de Fisher

(1954), que postula que los eventos de recombinación que se producen en las sucesivas meiosis luego del evento endogámico provocan una disminución del tamaño de los fragmentos que siguen una distribución de $1/2^g$ (siendo g el número de generaciones). De este modo, segmentos largos corresponden a eventos endogámicos recientes y aquellos de menor longitud corresponderían a eventos endogámicos ancestrales. De acuerdo con este modelo, las longitudes de los segmentos ROH seguirán una distribución exponencial con media $\frac{1}{2g}$ Morgan, donde g es el número de generaciones desde el último ancestro común. Así, por ejemplo, fragmentos de 1 cM o 0,01 Morgan (1Mb) corresponderían a un evento endogámico producido aproximadamente 50 generaciones atrás ya que $0,01 = \frac{1}{2^{*50}}$. Este modelo fue evaluado mediante un estudio de simulación *in-silico* por Howrigan y col. (2011) utilizando datos obtenidos de chips de SNP, tras lo cual su implementación fue seleccionada como técnica de elección para el análisis de los efectos de la consanguinidad ancestral y reciente. A su vez, varios estudios, como los realizados por McQuillan y col. (2008); Ferencakovic (2011), Perdomo-González y col. (2022), han reportado mayores correlaciones entre F_{PED} calculados a partir de un determinado número de generaciones y F_{ROH} estimados a partir de segmentos de longitud correspondiente a ese mismo número de generaciones.

Actualmente, el uso de los ROH no se restringe al estudio de la endogamia, sino que se emplean para diferentes propósitos. Estos segmentos fueron descritos en principio en humanos para estudiar la historia demográfica de las poblaciones (McQuillan y col., 2008) e identificar variantes asociadas a enfermedades (Hildebrandt y col., 2009). Sin embargo, en la actualidad su uso se ha extendido a otras especies y con diferentes tipos de estudio. Por ejemplo, se emplean para analizar huellas de selección en animales de producción (Zhang y col., 2015; Szymatola y col., 2016; Martínez-Rocha y col., 2022) así como también se emplean para monitorear la pérdida de variabilidad genética en especies silvestres con reducido tamaño poblacional (Kardos y col., 2018).

En base a los aspectos mencionados, el coeficiente molecular F_{ROH} constituye una herramienta útil y fiable, que presenta varias ventajas respecto al coeficiente F_{PED} para el estudio de endogamia y efectos de la depresión endogámica.

Calidad espermática como medida de fertilidad

La calidad espermática es uno de los rasgos más importantes que definen el potencial reproductivo de un macho. En los centros de inseminación artificial, el control de calidad de cada eyaculado se realiza rutinariamente, con la finalidad de utilizar solo aquellos individuos que cumplan con ciertos criterios mínimos, como poseer un número suficiente de espermatozoides con ciertas características importantes para la fertilización. Entre los diversos caracteres evaluados, la morfología, concentración y motilidad espermática suelen ser los más utilizados (Barth, 2007). Sin embargo, también existen parámetros adicionales fisiológicos, cinemáticos (relacionados a como se mueven los espermatozoides), y morfométricos (en los cuales se cuantifican las dimensiones de la cabeza espermática (Vincent y col., 2014)).

Por otro lado, ha sido ampliamente demostrado que la calidad espermática es afectada tanto por factores genéticos (Cochran y col., 2013) como ambientales (Brito y col., 2002). Entre los factores genéticos se pueden mencionar aquellos que afectan la forma de la cabeza del espermatozoide (Lavara y col., 2013), la motilidad (Mathevon y col., 1998; Burren y col., 2019) y sus patrones de movimiento (Borowska y col., 2018). A modo de ejemplo, varios defectos en la estructura y función de flagelos han sido explicados por mutaciones en genes que codifican para proteínas involucradas en la organización del axonema y movimiento flagelar, afectando la motilidad espermática y causando infertilidad (Pausch y col., 2016; Iso-Touru y col., 2019).

Ciertos parámetros de calidad espermática han sido asociados a la fertilidad, siendo los más comunes la motilidad total (Love, 2011), motilidad masal (David y col., 2015), progresividad (Kathiravan y col., 2008), y el porcentaje de espermatozoides normales (Chenoweth, 2005). Sin embargo, no se cuenta con un ensayo *in vitro* definitivo que determine el potencial de fertilización de un eyaculado, ya que los ensayos experimentales son realizados en entornos biológicos diferentes a los naturales, lo que puede influir en el comportamiento del espermatozoide. Además, el potencial real de fertilización de un espermatozoide está determinado por muchos factores (Gadea, 2005). A pesar de estas limitaciones, se ha demostrado que las pruebas de calidad espermática permiten descartar muestras deficientes y con bajo rendimiento reproductivo (Mocé y Graham, 2008), evitando el uso de animales con fertilidad reducida y por ende limitando las pérdidas económicas.

Análisis automatizado de la calidad espermática

En la actualidad, la utilización de métodos objetivos de análisis espermático en centros de reproducción es cada vez más habitual, principalmente debido a la disponibilidad de metodologías y equipamientos que funcionan de manera automática. Esto no solo minimiza el error del operador, sino que también disminuye el tiempo de las mediciones, permitiendo un análisis más preciso (Vincent y col., 2014). El sistema de análisis espermático asistido por computadora (CASA: *Computer-Assisted Sperm Analysis*) es una metodología automatizada que permite evaluar muestras de semen humano y animal a nivel estructural y funcional. Este sistema consta de un microscopio con una platina atemperada (a 37°C), que está conectado a una cámara integrada a una computadora, la cual cuenta con un *software* que permite realizar diferentes mediciones de la calidad espermática, como la concentración, motilidad, cinemática (velocidades y patrones de

movimiento de los espermatozoides), morfología y morfometría (determinación objetiva del tamaño del espermatozoide) (Figura 1).

El sistema CASA cuenta con varias ventajas respecto a los métodos convencionales de evaluación espermática, entre las que se pueden mencionar una mejora en la objetividad (Kathiravan y col., 2011), precisión (Gallego y col., 2018) y repetibilidad (Farrell y col., 1998) de las determinaciones, así como la capacidad de medir el comportamiento individual de cada espermatozoide, lo cual produce una gran cantidad de datos por cada muestra analizada. Sin embargo, también presenta algunas limitaciones. Entre ellas, la gran variabilidad de sistemas comerciales disponibles, que difieren en el tipo de *software* y el algoritmo utilizado (Yeste y col., 2018), o la frecuencia de captura de imágenes (Mortimer y Swan, 1999; Lu y col., 2014), que pueden influir en la medición de los parámetros cinemáticos (Valverde y col., 2020). A pesar de ello, el empleo de este sistema proporciona una valiosa información que, en condiciones definidas y estandarizadas, permite realizar comparaciones con otras muestras evaluadas de forma similar (Amann y Waberski, 2014), superando además en varios aspectos (tales como precisión y repetibilidad) a las técnicas manuales, tanto en el área de investigación como en la clínica médica (van der Horst y col., 2018).

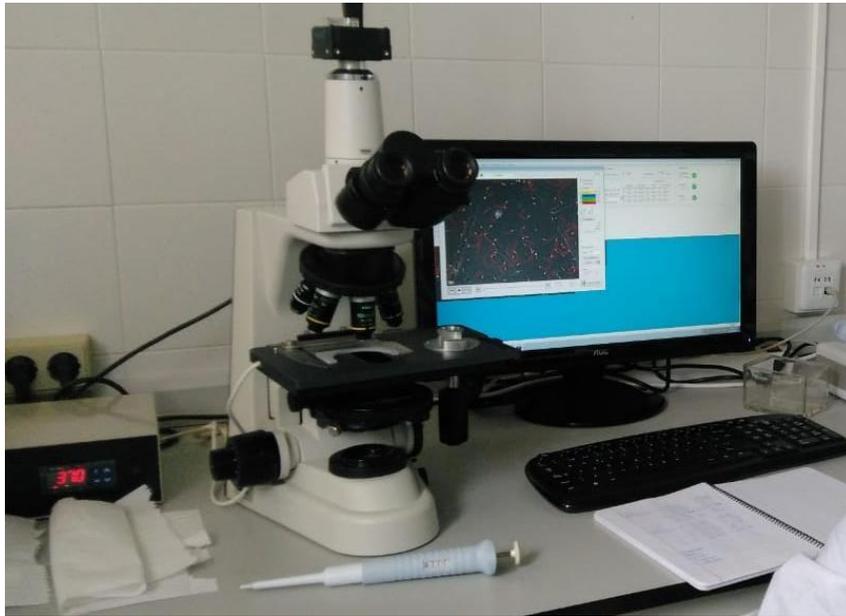


Figura 1. Sistema de análisis espermático asistido por computadora (CASA)

Morfometría espermática

Los espermatozoides son células complejas, tanto en su estructura como en su función. Morfológicamente, están formados por una cabeza, una pieza intermedia y una cola o flagelo. La cabeza está constituida principalmente por ADN empaquetado que contiene una versión haploide y recombinada del genoma paterno, el cual está recubierto en su parte apical por una vesícula que contiene las proteínas necesarias para permitir la entrada del espermatozoide en el ovocito al momento de la fecundación, conocida como acrosoma. Por el extremo opuesto se encuentra la zona intermedia, donde se ubican las mitocondrias encargadas de generar la energía necesaria para el movimiento del flagelo (cola), el cual se encuentra en posición distal, formado por microtúbulos dispuestos en forma regular.

La morfología espermática es un carácter que se evalúa de forma rutinaria en los centros de inseminación artificial ya que en los controles de calidad se requiere un elevado porcentaje de espermatozoides morfológicamente normales para considerar una muestra viable. En este análisis, se detecta a simple vista la presencia de alteraciones de mayor envergadura, como cabezas anormales (globozoospermia, espermatozoides piriformes, etc.), y defectos de la pieza media (p. ej. gota citoplasmática) o de la cola (colas partidas o quebradas). Por otro lado, la morfometría espermática, la cual determina de manera precisa las dimensiones de la cabeza y cola de cada espermatozoide, es un carácter menos considerado en los centros de reproducción, a pesar que ha sido asociada con la motilidad espermática, estableciéndose relaciones entre la forma del espermatozoide, su velocidad, y su patrón de movimiento, así como con su potencial de fertilización (Gomendio y Roldan, 2008). Si bien todas las partes del espermatozoide participan en el movimiento espermático, la forma de la cabeza es una de las más estudiadas, ya que además de presentar moderada heredabilidad (Lavara y col., 2013), ha sido asociada con la fertilidad (Ostermeier y col., 2001). En este sentido, Malo y col. (2006), encontraron una correlación positiva entre la longitud de la cabeza espermática y una mayor velocidad, en el ciervo colorado. Del mismo modo, Barquero y col. (2021) encontraron que variables como la longitud, elipticidad y rugosidad de la cabeza espermática, fueron significativas en un modelo de predicción del tamaño de camada en cerdos.

El análisis de morfometría de la cabeza espermática se puede llevar a cabo utilizando el método automatizado CASMA (*computer-assisted sperm morphometry analysis*) (Gravance y col., 1998), a partir del cual se obtienen mediciones de la longitud (L, mm), ancho (W, mm), área (A mm²) y perímetro (P, mm) de la cabeza de cada espermatozoide; y de cuatro parámetros derivados de ellos, como la elipticidad (ELI; L/W), la elongación (ELO; $(L-W)/(L + W)$), la rugosidad

$(4\pi A/P^2)$. Adicionalmente, se puede obtener el factor de forma ($p2A = P^2/4\pi A$), el cual ha sido positivamente correlacionado con la fertilidad en animales domésticos (Ramón y col., 2013).

El espermatozoide es una de las células más diversas en términos de morfología. Se ha planteado que dicha diversidad podría tener un rol evolutivo que le permitiría diversificar las posibilidades de fertilizar un ovocito (Helfenstein y col., 2010). Por tal motivo, al analizar la morfometría espermática es necesario evaluar una cantidad considerable de células por muestra para poder obtener fenotipos representativos de cada individuo. La información obtenida puede ser analizada estadísticamente utilizando métodos multivariados de jerarquización y agrupamiento, que permiten realizar análisis de subpoblaciones con características particulares de forma (Rubio-Guillén y col., 2007). El aumento de alguna de estas subpoblaciones se ha correlacionado con la calidad espermática. Por ejemplo, en un estudio *in-vitro*, la subpoblación de espermatozoides de cabezas cortas y anchas se correlacionó negativamente con la fertilidad a campo en carneros (Martínez-Rodríguez y col., 2016), mientras que la subpoblación de espermatozoides de cabezas alargadas fue significativamente más abundante en individuos del grupo de alta fertilidad en ovejas, que a su vez presentaron un mayor porcentaje de espermatozoides más rápidos y con movimiento lineal en comparación con el grupo de baja fertilidad (Yániz y col., 2015). Este y otros estudios sugieren que la motilidad y la morfología espermática pueden tener un cierto grado de correlación.

Motilidad espermática

En la actualidad la metodología CASA permite cuantificar de manera objetiva y precisa el porcentaje de espermatozoides motiles y progresivos, y además determinar ciertos parámetros cinemáticos, relacionados al patrón de movimiento de cada espermatozoide. Aunque existen varias opciones de *softwares* comerciales, todas se basan en el mismo principio: establecer un

centroide (eje) en la cabeza del espermatozoide y evaluar su trayectoria en dos dimensiones mediante capturas sucesivas (usualmente 25 a 50 imágenes por segundo, dependiendo del *software*), que reconstruyen la trayectoria espermática, calculando cinco parámetros cinemáticos diferentes: la velocidad curvilínea (VCL, expresada en $\mu\text{m/s}$), la velocidad en línea recta (VSL, expresada en $\mu\text{m/s}$), la velocidad media de la trayectoria (VAP, expresada en $\mu\text{m/s}$) ; dos parámetros relacionados a las características del desplazamiento: la amplitud de desplazamiento lateral de la cabeza del espermatozoide (ALH, expresado en μm) y frecuencia de batido, que expresa el número de veces que el centroide cruza la línea de su trayectoria promedio por unidad de tiempo (BCF, expresado en Hz). Adicionalmente, se determinan tres índices derivados de los ratios de las velocidades: linealidad (LIN, ratio de VSL/VCL, expresado en %), rectitud (STR, ratio de VSL/VAP, expresado en %), oscilación (WOB, ratio de VAP/VCL, expresado en %).

La naturaleza heterogénea de los espermatozoides es difícil de caracterizar mediante la estimación de medias y varianzas, ya que éstas difícilmente logran representar la variabilidad de una muestra espermática dada (Ramón y col., 2014). Sin embargo, es posible utilizar métodos estadísticos más avanzados que describen dicha variabilidad, como por ejemplo los análisis de componentes principales y de agrupamiento (Hook y Fisher, 2020). Este tipo de análisis es apropiado para los datos cinemáticos, debido principalmente a la correlación que existe entre algunas de las variables, lo que permite seleccionar solo aquellas que sean informativas y representen la variabilidad de los datos. Estos análisis permiten clasificar a los espermatozoides en grupos, denominados subpoblaciones (Holt y col., 2007), que muestran patrones de motilidad específicos, así como identificar espermatozoides hiperactivados, caracterizados por un movimiento vigoroso, errático y no progresivo asociado con el proceso de capacitación y fertilización (Yanagimachi, 1970). Por tal motivo, el estudio de subpoblaciones espermáticas está cobrando cada vez más importancia. Más aún cuando la proporción de ciertas subpoblaciones en

un eyaculado ha sido asociada con la capacidad de criopreservación de un individuo (Muiño y col., 2008), e incluso con la fertilidad (Maroto-Morales y col., 2015; Yániz y col., 2015; Ibanescu y col., 2020). Sin embargo, no existen estudios que evalúen el efecto de la endogamia sobre las subpoblaciones espermáticas, lo cual será abordado en la presente tesis.

Longevidad espermática

Otro aspecto a tener en cuenta al evaluar la calidad espermática es la capacidad de supervivencia de los espermatozoides a la crio-preservación, sobre todo en el bovino, donde comúnmente se emplean dosis (pajuelas) de semen crio-preservado en nitrógeno líquido. Este proceso de crio-preservación puede comprometer la calidad espermática, causando una disminución en la motilidad debido al estrés asociado al congelado y descongelado, que puede provocar daños en la estructura de los espermatozoides, principalmente en la integridad de la membrana plasmática (Grötter y col., 2019). Esta disminución de la motilidad puede evidenciarse directamente luego de descongelar la muestra, como ha sido probado en estudios comparativos de motilidad entre semen fresco y descongelado (Rasul y col., 2001; Riesco y col., 2020). Sin embargo, se ha planteado que los daños provocados por la crio-preservación pueden verse enmascarados inmediatamente luego de descongelar la muestra (Barth, 1993; Mocé y Graham, 2008). Por tal motivo se hace necesario realizar ensayos de longevidad espermática, determinando sistemáticamente la motilidad de una dosis durante un periodo de tiempo de dos a cuatro horas después del descongelamiento. Mediante este tipo de ensayo es posible evaluar no solo el daño estructural sino también el deterioro funcional de la célula, ya que permiten evaluar no solo la motilidad sino también la habilidad de los espermatozoides para mantenerse viables por el periodo de tiempo necesario hasta fertilizar el ovocito (Ahmed y col., 2017). Adicionalmente, mediante la utilización de CASA, se pueden determinar las fluctuaciones o

cambios en la cinemática espermática a lo largo de las horas, con la finalidad de entender los patrones de movimiento, y su posible rol en la fertilización.

Los experimentos de longevidad espermática llevados a cabo hasta la fecha se han enfocado en mejorar el ambiente externo del esperma, evaluando crioprotectores y diluyentes y/o diferentes técnicas de congelamiento para disminuir lo máximo posible el criodaño. Por el contrario, pocos han investigado la influencia genética en el patrón de motilidad espermática y su variación en el tiempo. Un ejemplo, es el estudio de Hoflack y col. (2007), quienes demostraron que las principales diferencias en términos de motilidad espermática entre animales pertenecientes a dos razas bovinas se debían principalmente al componente genético. De manera similar, Roca y col. (2006) determinaron que el componente genético de cada animal era un factor principal que afectaba la supervivencia espermática luego del descongelado. Sin embargo, ningún estudio ha empleado un enfoque genómico para determinar la existencia de genes y/o regiones genómicas que regulen la variación cinemática a través del tiempo en muestras crio-preservadas de semen bovino, ni tampoco cuál podría ser el efecto de la endogamia en este carácter.

Estudios de asociación de genoma completo

La creciente generación de información genómica ha hecho posible el estudio y descubrimiento de regiones genómicas involucradas en el control de caracteres complejos. Dichos hallazgos han sido realizados mayoritariamente mediante la implementación de estudios de asociación de genoma completo (GWAS, *Genome-Wide Association Studies*), en caracteres cuantitativos principalmente (Ferenčaković y col., 2017), entre los que se incluyen ciertos caracteres reproductivos (Diniz y col., 2014). En bovinos, varios estudios se han enfocado en determinar qué regiones en el genoma se encuentran asociadas con caracteres espermáticos (Peñagaricano y col., 2012; Puglisi y col., 2016; Ferenčaković y col., 2017), los cuales además,

suelen presentar una baja heredabilidad, y ciertas correlaciones entre sí en algunos casos (Fortes y col., 2020). Esto sugiere que comparten, al menos parcialmente, su base genética. Sin embargo, es importante considerar el efecto racial en la selección de dichos marcadores, como fue discutido en la revisión de Fonseca y col. (2018), quienes identificaron genes candidatos comunes entre varios GWAS de calidad espermática y características testiculares en bovinos taurinos y cebuinos, encontrando variantes tanto comunes como específicas para cada raza. A partir de dicho estudio, los autores dedujeron que la elección de marcadores genéticos para selección genómica debería tener en cuenta las variantes presentes en cada población.

Un punto importante para mencionar es que los fenotipos de calidad espermática normalmente utilizados en este tipo de análisis son aquellos comúnmente evaluados en los centros de inseminación, como número total de espermatozoides, concentración, motilidad (total y progresiva), defectos en la morfología, e integridad de membrana, entre otros. Por el contrario, pocos estudios han evaluado la cinemática espermática desde un punto de vista genómico a partir de datos obtenidos del sistema CASA (Puglisi y col., 2016; Borowska y col., 2018). Además, ninguno ha estudiado su variación en el tiempo. La cinemática espermática es un carácter complejo de evaluar y a su vez, es muy importante, debido a la importancia del patrón de movimiento espermático en la fertilización. Por otro lado, el uso de un enfoque combinado utilizando genómica y CASA podría ayudar a comprender los mecanismos genómicos asociados al efecto negativo de la crio-preservación en la motilidad luego del descongelado, como ha sido demostrado recientemente en un estudio preliminar realizado en equinos (Nikitkina y col., 2022).

Razas utilizadas en este trabajo

Las razas bovinas suelen poseer diferencias genéticas, debido al proceso de selección al que fueron sometidas a través de los años, así como también a los procesos demográficos que

experimentaron. Esto puede evidenciarse, por ejemplo, entre razas de diferente propósito, las cuales no solo se diferencian en sus frecuencias alélicas en loci localizados a lo largo de todo su genoma, sino que además pueden presentar regiones en donde la selección haya sido más específica, produciendo efectos fenotípicos diversos en diferentes caracteres. Estas diferencias pueden verse reflejadas en el patrón de distribución de haplotipos homocigotos a lo largo del genoma (Bomba y col., 2015). Siendo que existe un componente genético en la determinación de la calidad espermática, es esperable que se encuentren diferencias en caracteres como el patrón de movimiento, e incluso la respuesta a la crío-preservación y posterior longevidad espermática entre animales con un pool génico diferente. Por tal motivo, y para lograr obtener conclusiones más generales, en esta tesis se han analizado animales de tres razas criadas con propósitos diferentes: una raza lechera (Holstein), una raza carnífera (Aberdeen Angus) y una raza local seleccionada en base a su eco-adaptabilidad (Retinta). Las dos primeras razas han sido comercializadas a nivel mundial y, como consecuencia de la intensidad de selección aplicadas a las mismas, sería esperable encontrar regiones en homocigosis que se correspondan con QTL's relacionados con el propósito de producción de cada una de ellas. Por su parte, la raza Retinta, es una raza local, con características de rusticidad, cuya distribución principal se centra en la zona suroeste de España. Cuenta con registro genealógico desde 1993 y ha registrado altos valores de endogamia (Morales Cid, 2017), lo cual la convierte en una muestra poblacional adecuada para los propósitos de esta tesis.

Justificación

El análisis de la endogamia individual estimada a partir de ROH presenta muchas ventajas respecto al método tradicional. Mediante su utilización se puede estudiar el patrón de distribución de fragmentos a nivel individual y racial, y evaluar las posibles causas y consecuencias de su localización. Desde este enfoque, se pretende estudiar el mecanismo genético mediante el cual la endogamia repercute sobre la calidad espermática, evaluando las regiones enriquecidas en ROH y su potencial efecto sobre dichos caracteres.

La variabilidad intrínseca de la morfometría y motilidad espermática es el resultado de un proceso evolutivo para diversificar las chances de fertilizar el óvulo mediante competencia espermática. Sin embargo, el efecto de la endogamia en dicha diversidad no ha sido estudiado en profundidad. El sistema CASA permite capturar la variabilidad espermática, mediante la determinación de subpoblaciones espermáticas, con forma, tamaño y patrones de motilidad específicos. En este trabajo se pretende evaluar el efecto de la endogamia en dichas subpoblaciones e identificar sus consecuencias en la fertilización.

La evaluación de la longevidad espermática en muestras de semen crio-preservadas se realiza mediante un ensayo que evalúa la calidad de la muestra y presenta varias ventajas, ya que no solo mide la supervivencia del espermatozoide al proceso de congelación y descongelación, sino que determina su capacidad de motilidad varias horas luego del descongelado. Particularmente, estudiar la cinemática del movimiento en el tiempo permite conocer el patrón de motilidad e interpretar su rol en la capacidad fertilizante. El proceso de fertilización implica no solo el movimiento espermático, sino también la progresividad y la hiperactivación en determinado momento durante la capacitación. Debido a que este proceso ocurre un tiempo después desde que el espermatozoide es depositado en el tracto femenino, es necesario que

experimente ciertos cambios en el patrón de movimiento para optimizar su llegada al ovocito. El ensayo de longevidad *in-vitro* de muestras espermáticas puede dar una visión de este movimiento y permitir la inferencia de conclusiones relevantes.

Por último, estudiar la base genética de la longevidad espermática, mediante la identificación de marcadores genéticos asociados a dicho carácter, puede servir para identificar genes candidatos o variantes de marcadores que mejoren la precisión en la evaluación de una muestra espermática.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Hipótesis

- El aumento del nivel de consanguinidad individual causa una disminución en la calidad seminal y potencial fertilidad en toros. Dicho efecto fenotípico está regulado por la existencia de ROH en regiones específicas del genoma.
- La motilidad espermática y crio-resistencia tienen una base genética que está determinada por regiones del genoma que tienen un efecto fenotípico mayor.

Objetivos generales

- Determinar el efecto producido por el aumento de la endogamia y las rutas metabólicas potencialmente involucradas que afectan la calidad seminal del bovino.
- Estudiar las regiones genómicas asociadas a la motilidad y resistencia a la crio-preservación.

Objetivos específicos

- Identificar una muestra poblacional con diferentes grados de endogamia basados en registros genealógicos y moleculares.
- Estudiar la ocurrencia de ROH en grupos de animales de alta y baja consanguinidad, y su posible asociación a variaciones en la calidad seminal.
- Determinar las características seminales de dichos individuos mediante técnicas objetivas.
- Identificar SNP's asociados a los fenotipos encontrados mediante estudios de tipo GWAS.
- Identificar los genes y rutas metabólicas asociadas a los distintos fenotipos.

CAPÍTULO 1

Estudio de bloques de homocigosidad en una población bovina seleccionada de toros altamente endogámicos: Un análisis descriptivo y funcional revela patrones altamente variables

Este capítulo fue publicado como: D. Goszczynski, A. Molina, **E. Teran**, H. Morales-Durand, P. Ross, H. Cheng, G. Giovambattista, S. Demyda-Peyrás. Runs of homozygosity in a selected cattle population with extremely inbred bulls: Descriptive and functional analyses revealed highly variable patterns. PLOS ONE. 2018; 13(7): e0200069. DOI: 10.1371/journal.pone.0200069.

Introducción

La depresión endogámica es el fenómeno de reducción de la supervivencia y fertilidad en la descendencia de individuos emparentados. De acuerdo con Leroy (2014), la disminución de la aptitud reproductiva y adaptabilidad puede ser explicada por tres mecanismos genéticos: 1) un incremento en la expresión fenotípica de mutaciones deletéreas recesivas (hipótesis de dominancia parcial); 2) la carencia de ventajas fenotípicas dadas por los genotipos heterocigotos en loci que se mantienen en frecuencias intermedias por selección balanceadora (hipótesis de sobredominancia); y 3) una interacción epistática en la cual la probabilidad de combinaciones genéticas favorables es mayor en heterocitogos (hipótesis de epistasis). Sin embargo, Charlesworth y Willis (2009) propusieron como principal causa de la depresión endogámica la hipótesis de dominancia parcial, ya que los aportes de sobredominancia e interacción epistática aún no han sido identificados con claridad.

Los efectos de la depresión endogámica han sido observados en varias especies y taxones (Charlesworth y Charlesworth, 1987; Keller y Waller, 2002). En ganadería, la depresión endogámica ha sido asociada con la reducción en caracteres relacionados a la productividad, longevidad y capacidad de los individuos para afrontar los cambios del ambiente (Ercanbrack y

Knight, 1991; Sewalem y col., 2006; González-Recio y col., 2007; Saura y col., 2015). Sin embargo, se han reportado casos de poblaciones bovinas aisladas con altos niveles de endogamia que han subsistido por muchas generaciones (~240 años, de acuerdo con (Williams y col., 2016)).

El incremento en el coeficiente de endogamia promedio observado en el ganado en los últimos 20 años pudo haber sido causado por dos razones principales: 1) la alta intensidad de selección aplicada en los programas de mejora de razas altamente productivas (Stachowicz y col., 2011), y 2) el uso de poblaciones pequeñas y adaptadas en sistemas de producción extensivos y aislados geográficamente, caracterizados por la ausencia de un sistema de cruzamiento (Cecchi y col., 2012). En todos los casos, el coeficiente de endogamia F (Wright, 1922) es el parámetro más usado en los programas de mejora ya que puede ser determinado fácilmente a partir de los datos genealógicos de los animales (pedigrí). A través de su análisis se ha demostrado, en algunos casos, que la productividad individual comienza a ser afectada cuando F alcanza valores mayores a 5% (Hansen, 2000). En este sentido, Sewalem y col. (2006) demostraron que el riesgo de descarte aumentaba un 14% cuando los valores de F superaban el 6,25%. Por lo tanto, individuos con F mayores a 20% raramente se encuentran en cabañas comerciales (González-Recio y col., 2007). Este hecho es particularmente importante ya que estos animales altamente endogámicos constituyen la principal fuente de datos genómicos destinados a investigaciones en esta especie (Peripolli y col., 2017). Hasta donde se conoce, el único estudio que analiza el ganado doméstico altamente endogámico ha sido realizado en una población pequeña de ganado Chillingham aislado durante 67 generaciones en una isla de Inglaterra ($n=16$; Williams y col. (2016)).

El coeficiente F ha sido estimado convencionalmente a partir de datos genealógicos de pedigrí (F_{PED}) (Meuwissen y Luo, 1992), y también utilizando información genómica basada en microsatélites (F_{MIC}) (Fernández y Toro, 2006). No obstante, el desarrollo de tecnologías genómicas de alto rendimiento basadas en genotipos de SNP ha permitido plantear un nuevo enfoque para

determinar los niveles de endogamia de un individuo (Kristensen y col., 2010), el cual, se ha demostrado, es considerablemente más preciso y menos sesgado que F_{PED} , aun cuando la información de pedigrí es abundante (Kardos y col., 2015). Adicionalmente, las técnicas que usan SNPs permiten la estimación de valores de endogamia en individuos que no cuentan con datos de pedigrí disponibles (Villa-Angulo y col., 2009; de Roos y col., 2011). Uno de los enfoques más comunes para estudiar la endogamia consiste en determinar los bloques de homocigosidad (*runs of homozygosity*, ROH), que son segmentos continuos del genoma de largo definido donde ambos alelos de sus marcadores son idénticos y heredados de un ancestro común (usualmente denominados autocigotos) (McQuillan y col., 2008). Actualmente, el análisis de ROH ha sido ampliamente validado como una herramienta apta para estimar el nivel de endogamia individual (Peripolli y col., 2017) en varias especies incluyendo el ganado de carne (Ferenčakovic, 2011; Marras y col., 2015; Szymatka y col., 2016) y de leche (Kim y col., 2015; Gurgul y col., 2016). Así mismo, la longitud media de ROH ha sido asociada con el número de generaciones desde el último ancestro común (de acuerdo a la teoría de Fisher (1954) validada por Howrigan y col. (2011)), lo cual permite realizar inferencias respecto a la historia demográfica de una población dada.

La densidad del SNP-*array* utilizado para genotipar las muestras (número total de marcadores que incluye) y los parámetros iniciales provistos al algoritmo de detección, son esenciales para la identificación precisa de ROH (Ferenčaković y col., 2013). En este sentido, el uso de ajustes apropiados (determinados de acuerdo con la longitud esperada de ROH) son cruciales para evitar resultados sesgados debido a errores de genotipificación y datos faltantes (Peripolli y col., 2017). Se ha demostrado que los datos de genotipado de mediana densidad (MD \sim 50.000-70.000 SNPs) tienden a sobreestimar el número de fragmentos menores a 4 Mb, ya que muchos SNPs heterocigotos localizados dentro de los fragmentos no son genotipados (Ferenčaković y col., 2013). Por el contrario, datos de genotipado de alta densidad (AD \sim 700.000 SNPs) proveen un

mayor número de genotipos a expensas de mayores errores de genotipado y datos faltantes, aunque estas limitaciones se pueden compensar por un ajuste de los parámetros iniciales del modelo de detección, indicando así que los datos de genotipados de AD son una fuente más confiable. Sin embargo, la mayoría de los estudios en bovinos han sido realizados usando datos en MD, que es la manera en la cual los productores normalmente genotipan a los individuos de élite para usar en programas de mejora genómica (Kim y col., 2015).

En humanos, la acumulación de ROH en ciertas posiciones genómicas ha sido usada para analizar la historia demográfica de las poblaciones (Kirin y col., 2010). Esta estrategia también ha sido empleada para comparar y caracterizar razas de ganado de carne (Szmatoła y col., 2016) y de leche (Mastrangelo y col., 2016). Dado que lo ROH son normalmente abundantes en las regiones que se encuentran bajo selección positiva (Kardos y col., 2017), su acumulación en regiones específicas o “puntos calientes” (*hotspots*) ha sido estudiada para identificar partes del genoma que reflejen la selección direccional en ganado vacuno (Szmatoła y col., 2016). Sin embargo, recientemente se ha empleado el mismo análisis para detectar variantes funcionales asociadas a la depresión endogámica (Zhang y col., 2015), loci de caracteres cuantitativos (QTL's, (Biscarini, 2015)), y el mecanismo de control genético de caracteres reproductivos (Metzger y col., 2015; Ferenčaković y col., 2017) y enfermedades (Biscarini y col., 2016). Por otro lado, se cree que en las regiones con una baja abundancia de ROH, “puntos fríos” (Pemberton y col., 2012) se encuentran los *loci* de caracteres con funciones críticas, los cuales evitan las variantes recesivas letales o parcialmente deletéreas. En ambos casos, es importante mencionar que la herencia de tales fragmentos autocigotos también está sujeta a la estocasticidad de los eventos de recombinación por todo el genoma. En este sentido, la acumulación de ROH a lo largo del genoma se ha convertido en el punto de partida de otras técnicas que buscan identificar los factores biológicos que actúan detrás de los fenotipos de bajo rendimiento, como alternativas a los

estudios de asociación de genoma completo convencionales (Biscarini, 2015; Metzger y col., 2015; Biscarini y col., 2016; Szmatoła y col., 2016; Ferenčaković y col., 2017; Mastrangelo y col., 2017).

El ganado Retinto es la segunda raza bovina más numerosa en España, caracterizada por la calidad de su carne, rusticidad y su adaptación a pastizales marginales y clima extremo (Morales y col., 2013). Todos sus individuos han surgido de la región sur de la península española, criados bajo condiciones medioambientales secas y calurosas con escasos recursos de forraje (Jiménez y col., 2007). El plan de mejora del ganado Retinto fue establecido hace más de 3 décadas y se ha enfocado en la selección de animales con una tasa de crecimiento rápida y una vida productiva prolongada, adaptados a ambientes agrestes (Morales y col., 2017). Sin embargo, ya que los productores no suelen tener en cuenta el control de la consanguinidad, esta raza es un caso raro de individuos con F_{PED} altamente variables dentro de la población. Esto convierte a la raza Retinta en un modelo interesante para la investigación de la consanguinidad animal.

El objetivo de este trabajo fue caracterizar la ocurrencia de ROH en una población de Retinta con animales altamente endogámicos (AE) y con baja endogamia (BE). Se analizó la longitud, número y distribución genómica de ROH, obtenidos a partir de datos genotípicos de AD, así como la relación entre la longitud de ROH y los eventos recientes de endogamia obtenidos de los registros de pedigrí y microsatélites. También se determinaron las diferencias entre patrones de ROH en un grupo de individuos con el mismo incremento de F_{PED} en las últimas 3 generaciones para evaluar la fiabilidad de F_{PED} como un predictor de la depresión endogámica. Finalmente, se estimó la influencia de la tasa de recombinación en los patrones de ROH y se identificaron loci posiblemente afectados por la endogamia en individuos AE a través de un análisis funcional.

Materiales y métodos

Muestras

Las muestras fueron obtenidas de la Asociación Nacional de Criadores de Ganado Vacuno Selecto de Raza Retinta (ACRE). El ADN se extrajo de muestras de semen congelado (una por toro) usando el kit de purificación de ADN genómico de tejido, HigherPurity™ (Canvax Biotech, Córdoba, España). El manejo y cuidado de los animales durante la extracción de esperma se realizó siguiendo las normas propias del centro de reproducción CENSyRA (Badajoz, España). No fue necesaria la aprobación específica del comité de ética, ya que no se llevaron a cabo procedimientos experimentales en animales durante este estudio.

Se analizaron en total 54 toros pertenecientes al programa de Inseminación Artificial (IA) de la Asociación de Criadores de Ganado Vacuno Selecto de Raza Retinta (ACRE). Los individuos fueron seleccionados en base al número de generaciones equivalentes completas (GEC=6) y a los valores F_{PED} . Tanto los F_{PED} , F_{PED3} (F_{PED} de las últimas 3 generaciones) como GEC fueron determinados como se describe en Meuwissen y Luo (1992) y Maignel (1996), usando el software ENDOG (Gutiérrez y Goyache, 2005). El F_{MIC} fue calculado utilizando una prueba genómica basada en 17 microsatélites, recomendada por la Sociedad Internacional de Genética Animal para la prueba de parentesco como describen Caballero y Toro (2002), usando el software Molkin (Gutiérrez y col., 2005). Los toros fueron clasificados en dos grupos, altamente endogámicos (AE, $n=32$; F_{PED} promedio=0,164; variando entre 0,133 y 0,306) y de baja endogamia (BE, $n=22$; F_{PED} promedio= 0,008; variando entre 0 y 0,125)

Genotipado

Las muestras se genotipificaron utilizando el SNP-*array* de alta densidad de bovino Axiom® Genome-Wide BOS 1 (Affymetrix, Santa Clara, Ca, USA; 640.000 SNPs) en una plataforma

GeneTitan® Multi-Channel (Affymetrix), en el IGEVET (Universidad de La Plata, La Plata, Argentina). Los datos crudos fueron procesados utilizando el software Axiom™ Analysis Suite (Affymetrix) y estableciendo un *call rate* por individuo y marcador y DQC (*Data Quality Control*) de 0,97. No se aplicaron filtrados de los genotipos comúnmente utilizados, como la frecuencia alélica menor (MAF) o el desequilibrio de ligamiento (DL), ya que habrían llevado a una subestimación de la ROH (Ferenčaković y col., 2013), pudiendo interferir con algunos de los objetivos principales de este tipo de estudios (Williams y col., 2016; Kukučková y col., 2017). Sin embargo, los SNP's no asignados a un cromosoma específico o asignados a los cromosomas sexuales o al ADN mitocondrial fueron excluidos de los análisis. Luego de este procesamiento inicial, el número de marcadores para el análisis fue de 624.737.

Detección y clasificación de ROH

Los ROH fueron estimados utilizando el *software* cgaTOH (Zhang y col., 2013). El mínimo número de SNPs necesarios para constituir un ROH (L) fue calculado según Purfield y col. (2012), como:

$$L = \frac{\log_e\left(\frac{\alpha}{n_s \times n_i}\right)}{\log_e(1 - het)}$$

Donde n_s es el número de SNPs por individuo, n_i es el número de individuos, α es el porcentaje de falsos positivos de ROH (0,05), y het es la heterocigosidad promedio de todos los SNPs. Los ROH fueron divididos en 5 categorías según su longitud: 1-2 Mb, 2-4 Mb, 4-8 Mb, 8-16 Mb y > 16Mb. Los ROH cortos (<1 Mb) no fueron incluidos en el análisis ya que muchos de ellos podrían ser el producto de la herencia de haplotipos alocigotos comunes (Kim y col., 2015).

El número de heterocigotos (n_H) y genotipos faltantes (n_M) permitidos en cada categoría de ROH para cada cromosoma fue calculado como:

$$nH = \frac{mL}{dS} \times eG$$

$$nM = \frac{mL}{dS} \times mG$$

Donde m_L es la longitud mínima de ROH, d_S es la distancia promedio entre SNP's en el cromosoma, e_G es la tasa de error de genotipado (0,25% según los procedimientos estándar de Affymetrix), y m_G es la tasa media de genotipos faltantes en el cromosoma. El número de SNP's heterocigotos y faltantes permitidos por categoría de longitud y cromosoma es descrito en la Tabla Suplementaria 1. Debido a que el análisis por categoría de longitud de ROH se realizó secuencialmente de menor a mayor longitud, los ROH obtenidos en cada análisis fueron unidos en caso de solapamiento para evitar la subestimación de fragmentos largos, utilizando la función “*reduce*” de la librería de R *GenomicRanges* (Lawrence y col., 2013).

Caracterización de ROH y coeficiente endogámico basado en ROH (F_{ROH})

Se determinó la longitud media, mínima, máxima y desvío estándar para cada grupo y también por cromosoma, individuo y categoría de longitud. Las diferencias estadísticas se analizaron usando el t de Student con un nivel de significancia de 0,05. Los F_{ROH} se estimaron por individuo y cromosoma como la suma de todos los ROH dividido por la longitud total del genoma y cromosoma, respectivamente, según McQuillan y col. (2008). Los resultados se expresaron como el promedio \pm el error estándar de la media (S.E.M.).

Se evaluó la fiabilidad de F_{ROH} como estimador de endogamia comparándolo con F_{PED} , F_{PED3} (F estimado considerando los datos de pedigrí de las últimas tres generaciones) y F_{MIC} mediante correlación de Spearman, ya que la distribución de SNPs entre las muestras no cumplía la normalidad (test de Kolmogorov-Smirnov). La correlación entre $F_{ROH>8Mb}$ Y F_{PED} (seis generaciones), así como entre $F_{ROH>16Mb}$ y F_{PED3} (tres generaciones), fueron estimadas

particularmente para evaluar la relación entre la longitud de ROH y el número de generaciones desde el ancestro común, como fue propuesto por Fisher (1954).

Para determinar si los ROH se acumulaban en loci con bajas tasas de recombinación, se estimó la correlación entre el número de ROH detectados en una posición determinada y la tasa de recombinación en el mismo locus, utilizando los datos reportados por Ma y col. (2015). Este procedimiento se realizó en toda la población y en cada grupo por separado, tanto a nivel genómico como por cromosoma, y considerando, por un lado, todos los ROH y, por el otro, ROH>8Mb.

Análisis funcional de ROHi

Para identificar los posibles efectos en las funciones biológicas de los animales altamente endogámicos, se realizó un análisis de anotación funcional considerando los genes dentro de loci que estuvieron estadísticamente enriquecidos con ROH. Estos loci se determinaron realizando una prueba de permutación bajo la hipótesis nula de que los ROH están igualmente distribuidos a lo largo del genoma. El número de ROH en cada posición se aleatorizó un millón de veces usando scripts en JULIA (Bezanson y col., 2017). Luego, se calcularon valores de significancia p para cada posición como la frecuencia relativa de las aleatorizaciones que producían por azar un número de ROH más grande que el observado realmente. Finalmente, los intervalos genómicos significativamente enriquecidos se definieron como SNPs significativos consecutivos separados por menos de 1Mb. Estos intervalos se utilizaron para obtener listas de genes de *ENSEMBL BioMart v89* (Aken y col., 2016). El análisis *in-silico* se realizó utilizando la herramienta de agrupamiento de anotación funcional implementada en *DAVID* (Huang da y col., 2009) considerando las siguientes categorías de anotaciones: *Cog_Ontology*, *Up_Keywords*, *Up_Seq_Feature*, *Goterm_Bp_Direct* (procesos biológicos), *Goterm_Cc_Direct* (componentes celulares), *Goterm_Mf_Direct* (funciones moleculares), *Kegg_Pathway*, *Interpro* y *Smart*. La

rigurosidad de la clasificación se fijó en media y los grupos se definieron por puntuaciones de enriquecimiento superiores a 1,301, que es igual a $-\log_{10}(0,05)$. El análisis se realizó en el grupo completo de regiones estadísticamente enriquecidas (considerando todos los ROH, independientemente de su longitud) y en un grupo reducido que comprendía solo ROH>8Mb para evaluar el efecto de los fragmentos recientemente formados.

Resultados

Caracterización de ROH

El número de ROH fue estadísticamente diferente entre los grupos AE y BE ($106,96 \pm 37,56$ en AE vs $39,63 \pm 23,67$ en BE; $p < 0,001$). Esta diferencia estadística también se observó a nivel de la categoría de longitud (Tabla 1). La relación AE/BE en ROH>8Mb fue cuatro veces mayor que en cortos ROH, demostrando claramente una presencia mayor de ROH largos en el grupo altamente endogámico.

Tabla 1. Número de ROH detectados en cada grupo de endogamia de toros Retinta, por categoría de longitud. Las diferencias entre grupos fueron analizadas mediante un t de Student. Los resultados son expresados como media \pm error estándar de la media.

Longitud de ROH	Grupo AE	Grupo BE	p	AE/BE
1-2 Mb	$61,13 \pm 5,20^b$	$28,91 \pm 3,85^a$	3,00E-05	2,11
2-4 Mb	$22,28 \pm 1,71^b$	$7,00 \pm 1,15^a$	2,08E-08	3,18
4-8 Mb	$12,56 \pm 1,12^b$	$2,50 \pm 0,56^a$	9,90E-09	5,03
8-16 Mb	$7,47 \pm 0,89^b$	$0,86 \pm 0,25^a$	1,56E-07	8,65
>16 Mb	$3,53 \pm 0,55^b$	$0,36 \pm 0,14^a$	2,10E-05	9,71

Nota: Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,001$) según el test de Student

Un análisis similar se realizó por cromosoma, mostrando resultados similares, con diferencias estadísticas en 25 cromosomas diferentes (solo BTA5, BTA14, BTA25 y BTA27 fueron no significativos ($p > 0,05$; Figura 1)), sugiriendo que algunos cromosomas son más propensos a acumular ROH que otros.

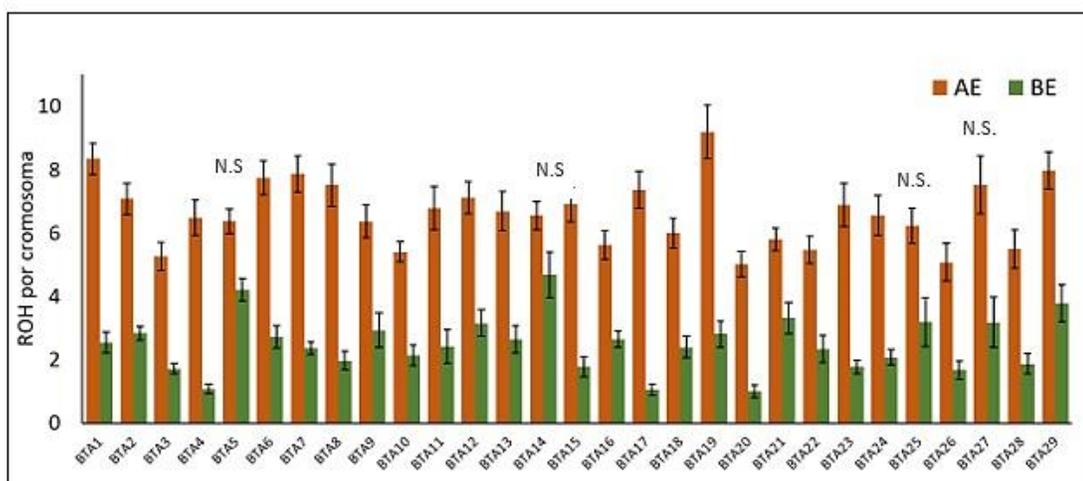


Figura 1. Número de ROH por cromosoma en toros Retinta de alta (AE) y baja (BE) endogamia. Los resultados son expresados como el número promedio de ROH por cromosoma \pm error estándar de la media. N.S.: No significativo, $p > 0,05$; test-T.

La longitud media de ROH también fue significativamente diferente entre grupos ($3,51 \pm 0,08$ Mb en AE vs $2,23 \pm 0,10$ Mb en BE; $p < 0,001$) (Figura 2A), pero el grupo AE mostró una mayor variación entre individuos (Figura 2B). En este sentido, la longitud media osciló entre 4,71 (A24) y 66,78 Mb (A4). Las muestras A7, A8, A10, A14, A24 y A30 presentaron menor variabilidad, careciendo de ROH $> 11,5$ Mb, aunque sus valores de F_{PED3} fueron superiores a 0,10. El grupo BE mostró menor variación, aunque las muestras B2, B8, B9 y B22 parecían ligeramente más variables en longitud de ROH (Figura 2B). Las muestras B2, B8, B9, B16, B17 y B22 presentaron ROH > 16 Mb aunque su F_{PED} fue cero. También se observaron diferencias significativas en la longitud de ROH por cromosoma, pero en una menor medida.

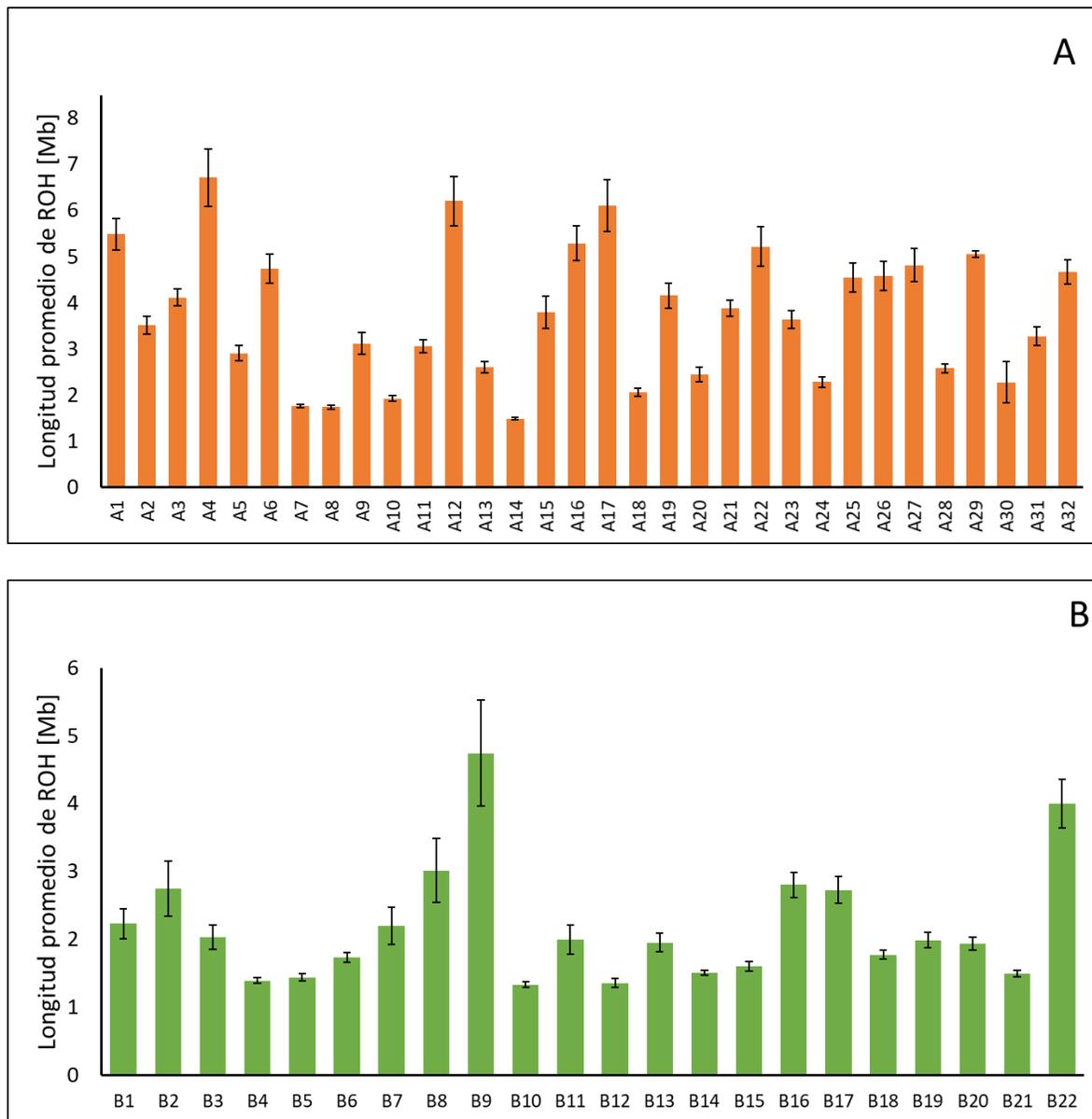


Figura 2. Variación individual en la longitud de ROH en toros Retinta de alta endogamia (AE;2A) y baja endogamia (BE;2B). Los resultados son expresados como la longitud promedio \pm error estándar por individuo.

Solo siete cromosomas mostraron diferencias estadísticamente significativas entre grupos (BTA1, BTA7, BTA10, BTA13, BTA18, BTA22 y BTA24; $p < 0,05$; Figura 3). El número de

cromosomas que tuvo ROH mayores a 20 Mb fue mayor en AE (25 cromosomas) que en el grupo BE (6 cromosomas). Curiosamente, se detectó un ROH muy largo (56,73 Mb) en BTA11 en la muestra B9. Los detalles de la distribución y longitud de ROH por individuo y cromosoma se resumen en las tablas Suplementaria 2 y Suplementaria 3, respectivamente.

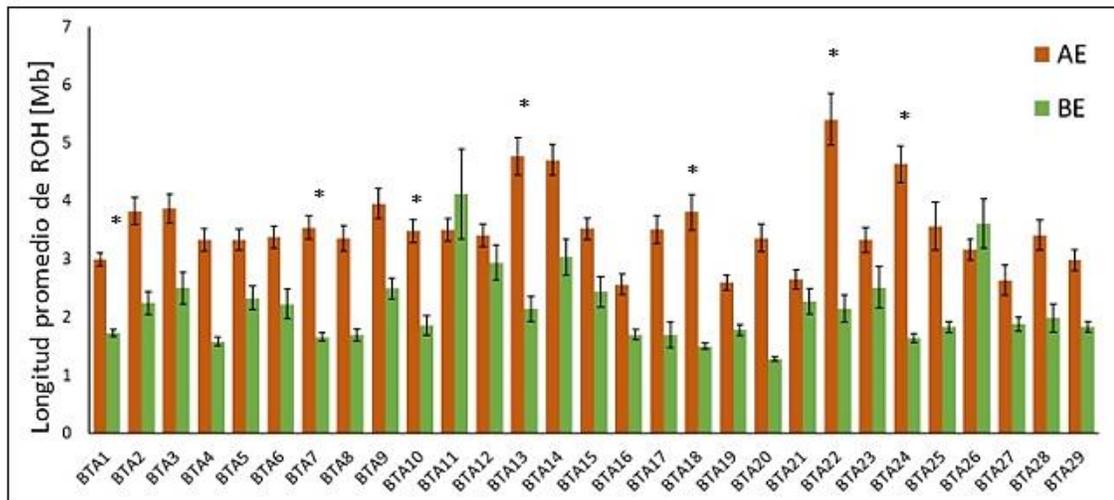


Figura 3. Variación cromosómica en la longitud de ROH en toros Retinta de alta (AE) y baja endogamia (BE). Los resultados son expresados como el número promedio de ROH por cromosoma \pm error estándar de la media. *: significativo, $p < 0,05$; t de Student por grupo.

Comparación de F_{PED} , F_{MIC} Y F_{ROH} como estimadores de identidad por descendencia (IBD, por sus siglas en inglés identical by descent)

La comparación entre los estimadores IBD reveló diferencias significativas entre las estimaciones obtenidas en todos ellos, pero particularmente en F_{MIC} , donde el p fue al menos dos veces más alto (Tabla 2). Además, F_{MIC} mostró el valor más alto en el grupo BE, así como la relación AE/BE más baja, lo que sugiere que los coeficientes de endogamia basados en microsatélites pueden tender a sobreestimar el valor en los individuos no consanguíneos.

En el grupo AE, los valores de F_{ROH} oscilaron entre 0,06 y 0,28 ($0,15 \pm 0,09$), mostrando una alta correlación con F_{PED} (0,79). Por el contrario, las correlaciones entre F_{PED} y F_{MIC} (0,44), y F_{ROH} y F_{MIC} (0,36) fueron mucho más bajas, lo que coincide con las comparaciones realizadas entre grupos. Las correlaciones entre F_{PED} y $F_{ROH>8Mb}$, F_{PED3} y $F_{ROH>16Mb}$, y $F_{PED3>0}$ (individuos con al menos un ancestro común en las tres últimas generaciones) y $F_{ROH>16Mb}$ fueron de 0,60, 0,54 y 0,42, respectivamente.

Tabla 2. Coeficientes de endogamia basados en pedigrí (F_{PED}), ROH (F_{ROH}) y microsatélites (F_{MIC}) para toros de alta (AE) y baja endogamia (BE) de la raza Retinta.

Coeficiente	AE	BE	p	AE/BE
F_{PED}	$0,1644 \pm 0,0101^b$	$0,008 \pm 0,0001^a$	1,00E-06	20,68
F_{PED3}	$0,0830 \pm 0,0121$	0	-----	-----
F_{MIC}	$0,1595 \pm 0,0613^a$	$0,1155 \pm 0,0001^a$	1,46E-02	1,38
F_{ROH}	$0,1510 \pm 0,0091^b$	$0,0356 \pm 0,0059^a$	5,40E-06	4,24
$F_{ROH[1-2]}$	$0,0320 \pm 0,0027^b$	$0,0150 \pm 0,0037^a$	1,10E-05	2,14
$F_{ROH[2-4]}$	$0,0247 \pm 0,0018^b$	$0,0077 \pm 0,0001^a$	1,30E-05	3,20
$F_{ROH[4-8]}$	$0,0272 \pm 0,0025^b$	$0,0054 \pm 0,0001^a$	4,20E-05	5,07
$F_{ROH[8-16]}$	$0,0317 \pm 0,0039^b$	$0,0038 \pm 0,0001^a$	1,00E-06	8,26
$F_{ROH[>16]}$	$0,0354 \pm 0,0057^b$	$0,0037 \pm 0,0001^a$	6,10E-06	9,55

Nota: AE: grupo de alta endogamia ($F_{PED} \geq 0,125$); BE: grupo de baja endogamia ($F_{PED} < 0,125$). AE/BE: relación entre los valores de AE y BE por coeficiente. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,001$) según el test-T.

Análisis de F_{ROH} por categoría de longitud y cromosoma

Los porcentajes del valor F_{ROH} explicados por cada categoría de longitud se muestran en la Figura 4. Los ROH cortos (1-2 Mb) representaron casi 50% del valor F_{ROH} en BE, mostrando una disminución en la contribución hacia la categoría de 8-16 Mb. Por otro lado, se observó una

contribución similar para cada categoría de longitud en AE. El porcentaje de F_{ROH} explicado por fragmentos cortos (1-2 Mb) fue significativamente mayor en BE, mientras que el porcentaje explicado por fragmentos largos (4-8 Mb, 8-16 Mb y > 16 Mb) fue significativamente mayor en AE.

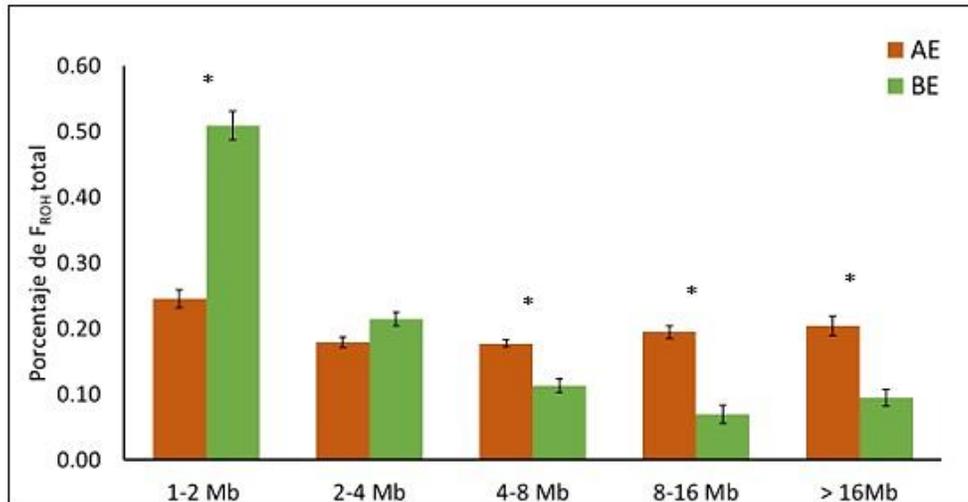


Figura 4. Porcentaje de valores de F_{ROH} por grupo endogámico de la raza Retinta, explicados por cada categoría de longitud de ROH.

*: $p < 0,05$. t de Student por grupo.

El análisis por cromosoma mostró un mayor F_{ROH} en AE en 26 cromosomas (Figura 5; $p < 0,05$). Sólo BTA21, BTA26 y BTA27 fueron no significativos, probablemente debido a la variabilidad observada entre los individuos, más que por una menor diferencia entre las medias. La variabilidad dentro de los grupos fue alta, pero algunos cromosomas, como BTA14, mostraron una mayor abundancia de ROH que otros (por ejemplo, BTA20) en ambos grupos. También cabe destacar que algunos individuos mostraron una abundancia inesperadamente alta de ROH en algunos de los cromosomas. Por ejemplo, B9, que tuvo el 57% de BTA11 cubierto por un solo ROH (datos no mostrados).

Efecto de la tasa de recombinación en la abundancia de ROH

La correlación entre la presencia de un ROH en una posición determinada (definida como el número de individuos con un ROH en esa posición) y la tasa de recombinación en el mismo locus fue -0,0132. Se obtuvieron resultados similares cuando el análisis se realizó por grupos ($r = -0,0178$ en AE y $r = -0,02715$ en BE) y por cromosoma (Tabla Suplementaria 4). Cuando se analizó toda la población, sin discriminar por grupos, la mayor correlación se encontró en BTA23 ($r = 0,11$). BTA28 mostró la mayor correlación en AE ($r = 0,11$) y BTA26 la mayor en BE (0,08). No se observaron correlaciones altas en el análisis de los ROH hipotéticamente recientes ($r = 0,0025$; 0,0003 y 0,028 para la población total, grupos AE y BE, respectivamente) ni en el caso de los cromosomas individuales (Tabla Suplementaria 4).

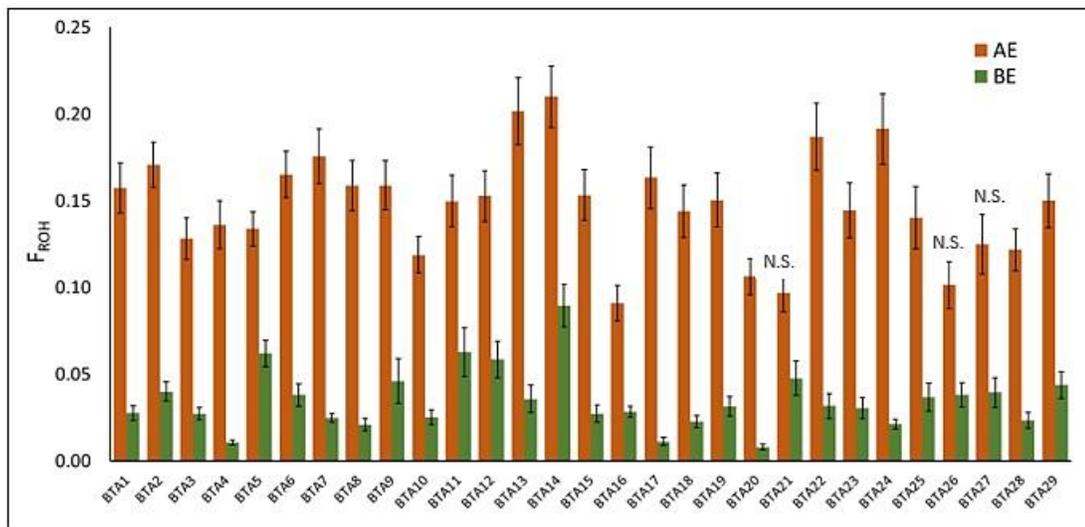


Figura 5. F_{ROH} por cromosoma por grupo, en grupos de toros Retinta de alta (AE) y baja (BE) endogamia.

Solo los cromosomas señalados como N.S. fueron no significativos ($p > 0,05$) entre grupos según el t de Student.

Localización genómica de ROH

La acumulación de ROH en todo el genoma de las muestras AE se analizó por categoría de longitud: todas las longitudes de ROH (Figura 6A), ROH>8Mb (Figura 6B) y ROH>16Mb (Figura 6C). Aunque la distribución de los ROH fue relativamente uniforme y la acumulación fue moderada en general, se encontraron algunos picos destacados con una alta ocurrencia de ROH. Por ejemplo, 26 animales presentaron ROH en el primer millón de bases (1.575 - 1.606.000) de BTA23, así como en BTA2 (71.882.569 - 73.223.813), BTA7 (51.003.562 - 53.466.651) y BTA29 (38.490.349 - 39.617.454) en menor medida. En el análisis de ROH>8 Mb (generados hipotéticamente en las últimas seis generaciones), la mayor ocurrencia (nueve individuos) se detectó en BTA24 (39.376.427 - 58.300.844). Por último, cuando se analizaron ROH>16Mb (tres generaciones desde el ancestro común), la mayor ocurrencia se encontró en BTA7, BTA13, BTA14, BTA18 BTA22 y BTA24. Curiosamente, dos cromosomas (BTA26 y BTA29) mostraron una completa ausencia de ROH> 16Mb.

Para demostrar la alta variabilidad dentro de los cromosomas, se graficó la distribución de la ROH en BTA24, que mostró la media de F_{ROH} y la longitud media de ROH más alta en el grupo AE (Figura 7). Cabe destacar que algunos individuos no presentaron ROH en dicho cromosoma (A1, A9, A10, A15 y A26). Por el contrario, algunos individuos albergaban ROH en más del 60% de la extensión cromosómica de BTA24 (A13 y A32).

Por último, se analizó la relación de F_{PED} con ROH graficando la distribución en todo el genoma de ROH>16Mb en 12 individuos que presentaban el mismo valor de F_{PED3} (0,125) (Figura 8). Se observó que el patrón de distribución de los fragmentos ROH adquiridos hipotéticamente durante las últimas 3 generaciones era muy desigual y variable entre los individuos. Además, no se detectaron ROH>16Mb en la muestra A10 ni en siete cromosomas (BTA2, BTA17, BTA21,

BTA24, BTA26, BTA28 y BTA29). Estos resultados sugieren que el efecto fenotípico de la endogamia en individuos con el mismo valor de F_{PED} podría ser altamente divergente.

Regiones genómicas diferencialmente afectadas por la endogamia

Para analizar las funciones biológicas hipotéticamente afectadas en las zonas con alta abundancia de ROH, se obtuvo una lista de genes de los intervalos significativamente enriquecidos según la prueba de permutación. Similar al análisis anterior, para caracterizar los fragmentos recién formados, se realizaron análisis separados para todos los ROH (sin restricción de longitud) y solo para ROH>8Mb.

Las listas de genes obtenidas se sometieron a la plataforma DAVID para el análisis de anotación funcional. Cuando se consideraron todas las longitudes de los fragmentos, el número de genes obtenidos fue de 769. Estos genes estaban distribuidos en 22 cromosomas diferentes, pero ocho de ellos estaban poco representados (menos de 10 genes). Los cromosomas más representados en términos de genes en ROH fueron BTA7, BTA14 y BTA12 con 108, 94 y 77 genes, respectivamente. En el análisis de anotaciones funcionales se detectaron tres grupos funcionales significativos (Tabla 3). El que tuvo la mayor puntuación de enriquecimiento estaba relacionado con procesos catabólicos de proteínas e implicaba a la familia de genes *PAG*.

Estos genes están localizados en BTA29 y codifican precursores de la familia de glicoproteínas asociadas a la preñez (*PAG1*, *PAG4*, *PAG7*, *PAG15*, *PAG16*, *PAG19*, *PAG20* y *PAG21*), un grupo de proteasas aspárticas secretadas por la placenta. El segundo grupo más enriquecido estaba relacionado con 5 genes de *β -defensina*, que codifican péptidos antimicrobianos que se encuentran en los glóbulos blancos. Al estudiar las regiones ROH>8Mb, hipotéticamente formadas

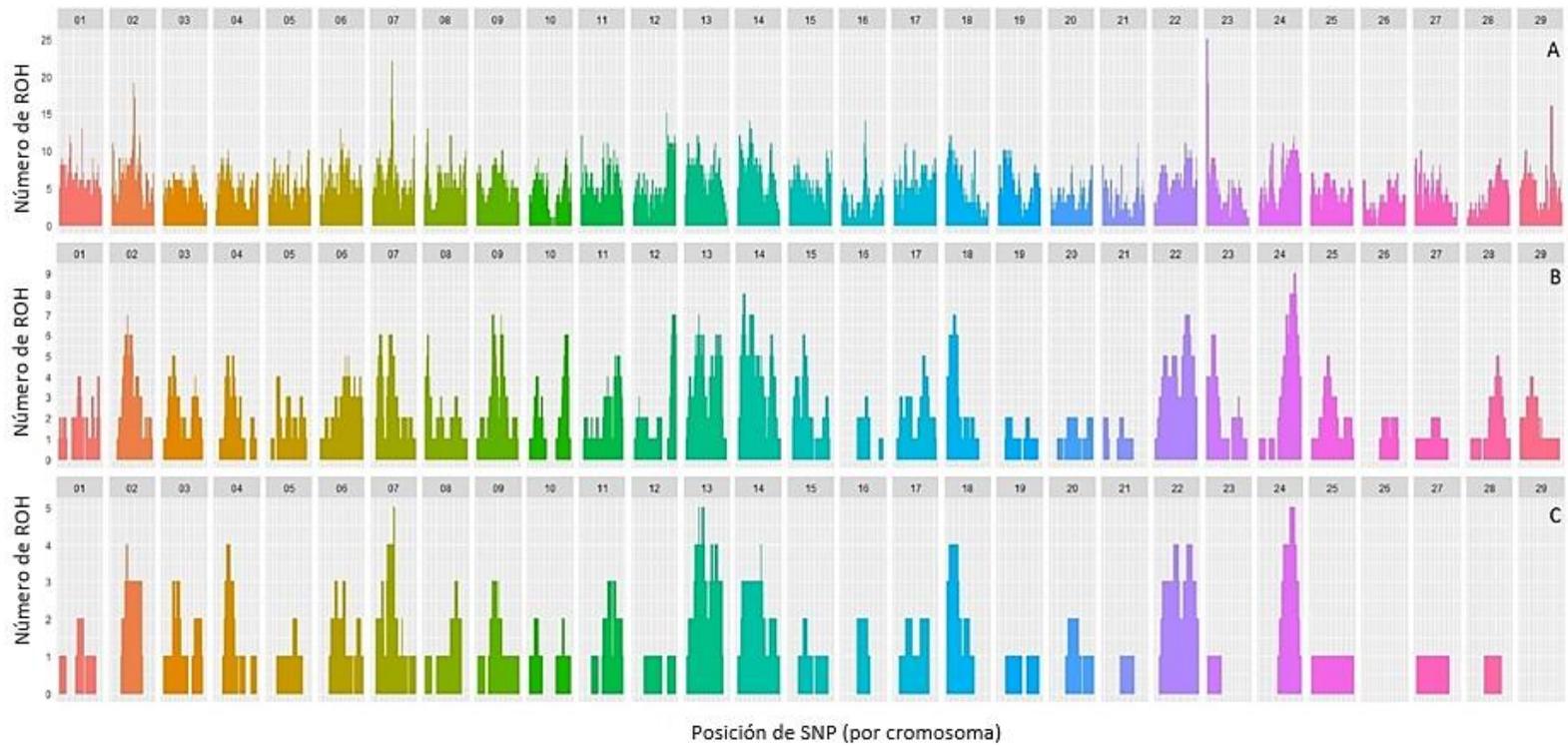


Figura 6. Acumulación de ROH a través del genoma en el grupo AE de toros Retinta. Número de ROH detectados en cada posición de SNP del chip considerando diferentes categorías de longitud de ROH. A: F_{ROH} total; B: F_{ROH} 8-16Mb; C: F_{ROH} >16Mb.

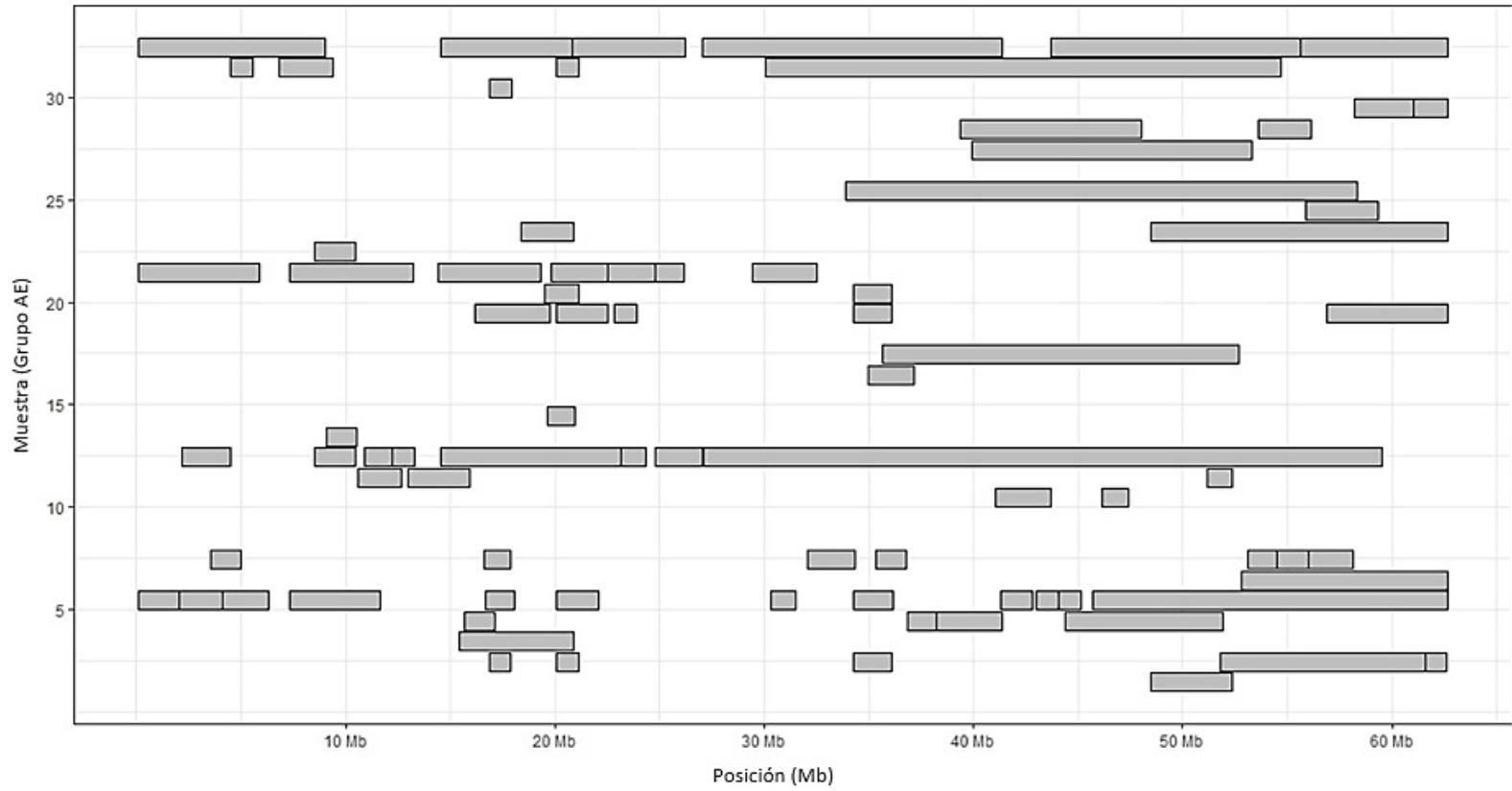


Figura 7. Distribución física de ROH sobre BTA24 en el grupo AE de toros Retinta.

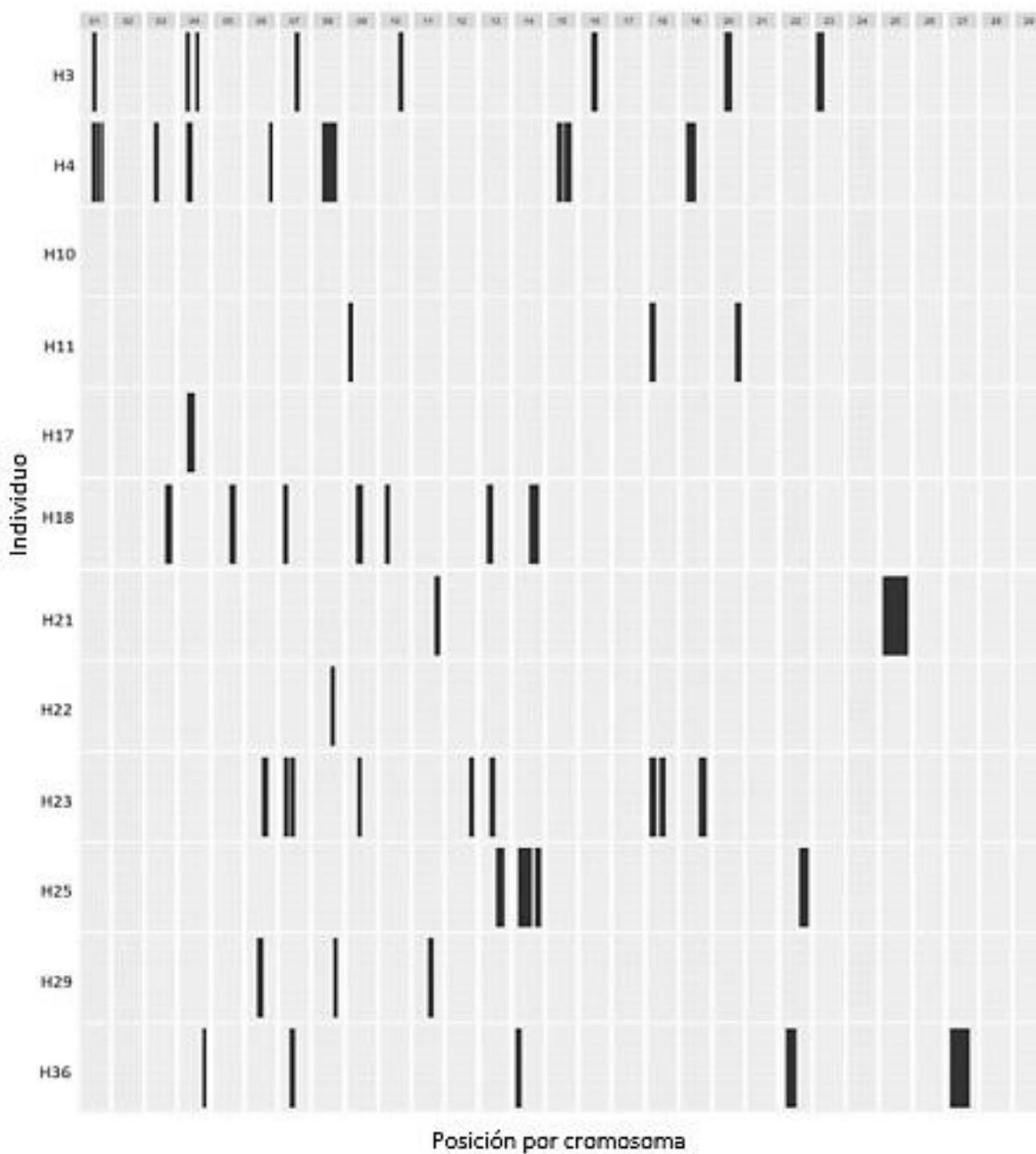


Figura 8. Distribución física de ROH > 16Mb en el grupo AE de toros Retinta con el mismo coeficiente de endogamia calculado a partir de datos de pedigrí de las últimas tres generaciones ($F_{PED3} = 0,125$).

Tabla 3. Agrupación de anotaciones funcionales de genes en regiones con alta acumulación de ROH en el grupo AE de toros Retinta.

Cluster 1		Enrichment score: 8,96		
Categoría	Término	p	Genes	Fold Enrichment
INTERPRO	Propeptide, peptidase A1 (IPR012848)	2,45E-13	<i>PAG1, PAG4, PAG5, PAG7, PAG15, PAG16, PAG17, PAG18, PAG19, PAG20, PAG21, LOC504812, LOC614287, MGC157405, MGC157408</i>	14,36
INTERPRO	Peptidase A1 (IPR001461)	1,35E-12	<i>PAG1, PAG4, PAG5, PAG7, PAG15, PAG16, PAG17, PAG18, PAG19, PAG20, PAG21, LOC504812, LOC614287, MGC157405, MGC157408</i>	13,02
INTERPRO	Aspartic peptidase (IPR021109)	1,48E-11	<i>PAG1, PAG4, PAG5, PAG7, PAG15, PAG16, PAG17, PAG18, PAG19, PAG20, PAG21, LOC504812, LOC614287, MGC157405, MGC157408</i>	11,26
GOTERM_MF_DIRECT	Aspartic-type endopeptidase activity (GO:0004190)	1,22E-10	<i>PAG1, PAG4, PAG5, PAG7, PAG15, PAG16, PAG17, PAG18, PAG19, PAG20, PAG21, LOC504812, LOC614287, MGC157405, MGC157408</i>	9,76
INTERPRO	Peptidase aspartic, active site (IPR001969)	2,00E-10	<i>PAG1, PAG4, PAG5, PAG7, PAG15, PAG16, PAG17, PAG18, PAG20, PAG21, LOC504812, LOC614287, MGC157405</i>	12,03
UP_KEYWORDS	Aspartyl protease	2,08E-10	<i>PAG1, PAG4, PAG5, PAG7, PAG15, PAG16, PAG17, PAG18, PAG20, PAG21, LOC504812, LOC614287, MGC157405</i>	12,00
GOTERM_BP_DIRECT	Protein catabolic process (GO:0030163)	2,15E-09	<i>PAG1, PAG4, PAG7, PAG15, PAG16, PAG17, PAG18, PAG20, PAG21, LOC504812, LOC614287, MGC157405</i>	8,97
GOTERM_BP_DIRECT	Proteolysis (GO:0006508)	0,0002	<i>GGH, PAG1, PAG4, PAG5, PAG7, PAG15, PAG16, PAG17, PAG18, PAG20, PAG21, LOC504812, LOC614287, MGC157405, PROZ, TPP2</i>	2,83
UP_KEYWORDS	Protease	0,0002	<i>CASP8, CLPP, CTSB, CTSC, CTSZ, ECE2, F7, F10, PAG1, PAG4, PAG5, PAG7, PAG15, PAG16, PAG17, PAG18, PAG19, PAG20, PAG21, PARL, NPEPL1, USP4, USP14, TPP2, LOC504812, LOC614287, MGC157405</i>	2,27

Cluster 2		Enrichment Score:2,03		
Categoría	Término	p	Genes	Fold Enrichment
SMART	DEFSN (SM00048)	0,0005	<i>DEFB1, DEFB4A, DEFB5B, DEFB10, EBD</i>	12,18
INTERPRO	Beta defensin/Neutrophil defensin (IPR006080)	0,0006	<i>DEFB1, DEFB4A, DEFB5B, DEFB10, EBD</i>	11,57
INTERPRO	Beta defensin type (IPR001855)	0,0012	<i>DEFB1, DEFB4A, DEFB5B, DEFB10, EBD</i>	9,92
UP_KEYWORDS	Defensin	0,0061	<i>DEFB1, DEFB4A, DEFB5B, DEFB10, EBD</i>	6,59
UP_KEYWORDS	Antibiotic	0,0204	<i>DEFB1, DEFB4A, DEFB5B, DEFB10, EBD, PENK</i>	3,78
UP_KEYWORDS	Antimicrobial	0,0445	<i>DEFB1, DEFB4A, DEFB5B, DEFB10, EBD, PENK</i>	3,08
GOTERM_BP_DIRECT	Defense response to bacterium (GO:0042742)	0,0733	<i>DEFB1, DEFB4A, DEFB5B, DEFB10, EBD, NOS2, PENK</i>	2,38
Cluster 3		Enrichment score:1,54		
Categoría	Término	p	Genes	Fold Enrichment
UP_KEYWORDS	Microtubule	0,0052	<i>AURKA, DYNLL2, DYNLRB2, HAUS1, KATNAL2, KIF20A, NDRG1, REEP4, SKA1, TUBB1, TUBB4A, TUBGCP3</i>	2,68
UP_KEYWORDS	Cytoskeleton	0,0485	<i>AURKA, CETN1, CETNNA1, DAG1, DMTN, DYNLL2, DYNLRB2, FAM110B, FER, HAUS1, KATNAL2, KIF20A, MAP6D1, NDRG1, PDLIM2, PPP2CA, REEP4, RHOA, ROCK1, SKA1, TUBB1, TUBB4A, TUBGCP3</i>	1,55
GOTERM_CC_DIRECT	Microtubule (GO:0005874)	0,0968	<i>DYNLL2, DYNLRB2, HAUS1, KATNAL2, KIF20A, NDRG1, REEP4, SKA1, MAP6D1, TUBB1, TUBB4A</i>	1,83

en las últimas seis generaciones, se obtuvieron 362 genes, distribuidos en siete cromosomas diferentes. Los más representados fueron BTA22, BTA24 y BTA14, con 87, 68 y 64 genes, respectivamente. A su vez, se identificaron tres grupos significativos en el análisis de anotación funcional (Tabla 4). El más significativo estaba relacionado con el ensamblaje de los microtúbulos del flagelo y de los cilios e involucraba a 4 genes (*DNAAF1*, *DNAH1*, *LRRC6* y *ZMYND10*). Los dos grupos restantes estaban relacionados con la unión y el metabolismo del calcio y el metabolismo del ácido hialurónico.

Tabla 4. Agrupación de anotaciones funcionales de genes en regiones con alta acumulación de ROH presuntamente recientes (>8Mb) en el grupo AE de toros Retinta.

Cluster 1		Enrichment score: 2,265		
Categoría	Término	p	Genes	Fold Enrichment
GOTERM_BP_DIRECT	Inner dynein arm assembly (GO:0036159)	0,0005	<i>ZMYND10, LRRC6, DNAH1, DNAAF1</i>	23,23
GOTERM_BP_DIRECT	Motile cilium assembly (GO:0044458)	0,0145	<i>ZMYND10, LRRC6, DNAAF1</i>	15,84
GOTERM_BP_DIRECT	Outer dynein arm assembly (GO:0036158)	0,0202	<i>ZMYND10, LRRC6, DNAAF1</i>	13,40
Cluster 2		Enrichment score: 1,825		
Categoría	Término	p	Genes	Fold Enrichment
SMART	IQ motif (SM00015)	0,0071	<i>IQCF1, LOC100125949, IQCF2, IQCF5, MYOB5B</i>	6,46
UP_SEQ_FEATURE	IQ 1 (domain)	0,0085	<i>IQCF1, IQCF2, IQCF5</i>	20,44
UP_SEQ_FEATURE	IQ 2 (domain)	0,0085	<i>IQCF1, IQCF2, IQCF5</i>	20,44
GOTERM_MF_DIRECT	Calmodulin binding (GO:0005516)	0,0322	<i>MAPKAPK3, IQCF1, IQCF2, KCNQ3, IQCF5</i>	4,14

INTERPRO	IQ motif, EF-hand binding site (IPR000048)	0,0448	<i>IQCF1, IQCF2, IQCF5, MYOB5B, LOC100125949</i>	3,73
----------	--	--------	--	------

Cluster 3 **Enrichment score: 1,596**

Categoría	Término	p	Genes	Fold Enrichment
GOTERM_BP_DIRECT	Hyaluronan metabolic process (GO:0030212)	0,0001	<i>ITIH3, HYAL1, ITIH1, ITIH4</i>	38,72
UP_SEQ_FEATURE	VIT (domain)	0,0019	<i>ITIH3, ITIH1, ITIH4</i>	40,87
INTERPRO	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain, C-terminal (IPR010600)	0,0028	<i>ITIH3, ITIH1, ITIH4</i>	35,37
SMART	VIT (SM00609)	0,0053	<i>ITIH3, ITIH1, ITIH4</i>	26,01
INTERPRO	VIT domain (IPR013694)	0,0095	<i>ITIH3, ITIH1, ITIH4</i>	19,65
UP_SEQ_FEATURE	VWFA (domain)	0,0415	<i>ITIH3, ITIH1, ITIH4</i>	9,08

Discusión

En este trabajo, se caracterizó la abundancia y la distribución de ROH en una población de bovinos con individuos de alta y baja endogamia. A la fecha, éste es el primer estudio genómico que utiliza el genotipado de alta densidad para analizar la relación entre los fragmentos ROH y los eventos de endogamia recientes conocidos en una población de ganado bovino con valores contrastantes de F_{PED} . También es el primer análisis de una población bovina que ha sido criada y seleccionada en condiciones estandarizadas y que puede ser agrupada en dos grupos divergentes en términos de valores individuales de endogamia.

F_{ROH} como estimador de la consanguinidad en ganado altamente endogámico

Nuestros resultados mostraron una mayor correlación entre F_{PED} y F_{ROH} , en comparación con trabajos anteriores (Kim y col., 2015), pero sólo cuando se consideró la población completa. Las correlaciones fueron menores cuando se analizaron ambos grupos por separado, mostrando valores más consistentes con los reportados previamente (Peripolli y col., 2017). Se indicaron tres posibles causas como fuente de divergencia entre F_{ROH} y F_{PED} : 1) la persistencia de ROH cortos ancestrales a través del tiempo debido a las bajas tasas de recombinación, que se ignoran en la estimación de F_{PED} (Ferenčaković y col., 2013), 2) la profundidad y fiabilidad de la información del pedigrí (Kardos y col., 2015; Zhang y col., 2015) y 3) la naturaleza estocástica de la herencia de los fragmentos IBD (Curik y col., 2017). En el presente estudio, los errores del pedigrí se minimizaron utilizando pruebas moleculares de parentesco para todos los individuos. Asimismo, los datos del pedigrí se mostraron fiables, ya que los animales de baja consanguinidad (BE) mostraron bajos valores de F_{ROH} , lo que puede indicar que los eventos de endogamia ocurridos en la población antes de la quinta generación parental son escasos. Por esta razón, se sugiere que las correlaciones obtenidas son fiables. Por el contrario, las estimaciones de endogamia basadas en

microsatélites (F_{MIC}) estuvieron poco correlacionadas tanto con F_{PED} como con F_{ROH} , demostrando que el uso de estos marcadores es una fuente poco fiable de información para calcular consanguinidad, y más aún en individuos altamente endogámicos. Este hecho fue descrito previamente en el ganado vacuno, pero utilizando una población moderadamente consanguínea, por Baumung y Sölkner (2003).

Tiempo atrás, Howrigan y col. (2011) validaron la relación entre la longitud del ROH y el número de generaciones desde el ancestro común mediante simulaciones a gran escala. El estudio se basó en el concepto propuesto por Fisher (1954) en el que, la longitud de los fragmentos de ROH se asociaría con el número de generaciones desde el ancestro común. Por ejemplo, mostraron que los ROH>16Mb son probablemente heredados de padres que compartieron un ancestro común tres generaciones atrás. Más recientemente, Marras y col. (2015) y Ferenčaković y col. (2013) analizaron este concepto en poblaciones comerciales de varias razas bovinas, pero utilizando individuos con bajo F_{PED} . Dado que la población analizada en el presente estudio tenía una historia bien conocida de endogamia reciente, se esperaba una mayor correlación entre las estimaciones procedentes de ROH largos (F_{ROH} derivados de ROH>8MB y ROH>16Mb) y los valores de F_{PED} del número de generaciones correspondiente (F_{PED} para seis y F_{PED3} para tres). En general, el aumento de la longitud de los ROH y los eventos de endogamia reciente en los individuos consanguíneos estuvieron asociados, mostrando correlaciones entre 0,42 y 0,6 cuando se utilizó la longitud de ROH para estimar el F_{ROH} . Sin embargo, estas correlaciones fueron inferiores a la correlación global obtenida mediante el análisis de toda la población. Una posible explicación es la naturaleza estocástica de la herencia de la IBD (Curik y col., 2017). Sin embargo, Kardos y col. (2015) demostraron que el coeficiente F_{PED} puede ser fácilmente subestimado cuando la profundidad del pedigrí es inferior a 20 generaciones. En nuestro caso, el F_{PED} se estimó utilizando

sólo 6 generaciones equivalentes completas en promedio, por lo que no se tuvo en cuenta la influencia de los ancestros comunes anteriores.

Distribución de diferentes longitudes de ROH

La longitud del ROH fue muy variable entre y dentro de los dos grupos. Por ejemplo, cinco muestras de BE mostraron ROH de más de 20 Mb, cuando no se esperaba la presencia de ROH largos. Aunque la longitud media de la ROH debería reflejar en cierta medida el número de generaciones desde el ancestro común, también se debe considerar que la formación de la ROH es un proceso complejo en el que intervienen tasas dinámicas de recombinación a lo largo del genoma y también la naturaleza estocástica de los procesos de formación de gametos (Mastrangelo y col., 2017). En el presente estudio, esta hipótesis también fue respaldada por la variación detectada en el grupo AE, donde algunos animales tenían ROH de hasta 50 Mb (hipotéticamente producido por un evento de endogamia ocurrido una generación atrás), lo que fue inconsistente con su valor de F_{PED} . También se describió una variabilidad similar en el ganado pardo suizo y en ovejas del Valle de Belice (Ferenčaković y col., 2013; Mastrangelo y col., 2017). Sin embargo, en ambos estudios no se disponía de datos de pedigrí, limitando así la comparación entre F_{PED} y la longitud de ROH.

También se observaron diferencias significativas en el número de ROH detectados por categoría de longitud. Los ROH más cortos predominaban en BE, pero disminuyeron a medida que aumentaba la longitud. Este patrón puede atribuirse a una "endogamia fundacional" producida durante la creación de la raza, como se sugiere en otras razas y especies (Marras y col., 2015; Zavarez y col., 2015; Szmatoła y col., 2016). Por otro lado, AE mostró un número de ROH de las categorías 8-16 Mb y ROH>16 Mb que fue ocho y diez veces mayor que en BE, respectivamente.

Hasta la fecha, no se habían evidenciado grandes diferencias en el número de ROH en el ganado de una misma raza. En este caso, el diseño experimental, que incluía dos grupos de animales que divergían sólo en términos de consanguinidad (misma raza, esquema de selección y objetivos de cría) podría explicar las diferencias observadas entre los grupos. En cualquier caso, estos resultados fueron consistentes con lo esperado, ya que los eventos de endogamia que ocurrieron más recientemente (6 generaciones) tendieron a producir fragmentos de ROH más largos. El hecho de que sólo el 1,5% del genoma estuviera cubierto por ROH cortos en BE puede indicar que la población original a partir de la cual se fundó la raza Retinta hace 50 generaciones era amplia y escasamente seleccionada.

Distribución cromosómica de ROH

En un estudio reciente, Zavarez y col. (2015) reportaron una baja variación en la distribución de los ROH entre los cromosomas de las vacas Nelore, con valores de F_{ROH} que oscilaban entre 0,05 y 0,1. Por el contrario, Ferenčaković y col. (2013) y Szmatoła y col. (2016) demostraron que la longitud de los ROH y su localización en el genoma podían ser extremadamente variables en el ganado vacuno. En el presente estudio, el grado de variación entre los cromosomas fue elevado, lo que concuerda con esto último. Esta variación entre y dentro cromosomas se ha descrito también en poblaciones de ganado vacuno lechero (Zhang y col., 2015) y de carne (Szmatoła y col., 2016), pero con bajos niveles de endogamia y en menor medida. Estos hallazgos pueden sugerir que algunos loci genómicos soportan menos la acumulación de IBD que otros. En este caso, puede explicarse por la existencia de alelos deletéreos en ROH localizados en regiones específicas. Por ejemplo, en regiones con una restricción genómica sistemáticamente menor (Szpiech y col., 2013). Esos alelos disminuirán la abundancia de ROH en esas localizaciones, ya que, si una variante en una población es letal en forma homocigota, la endogamia aumentará en gran medida la posibilidad de generar un genotipo letal. En este sentido,

es razonable pensar que los “puntos calientes” detectados podrían haberse producido principalmente por el apareamiento de individuos emparentados en ausencia de condiciones adicionales que puedan diferenciar los grupos analizados. Pero, además, el hecho de que las tasas de recombinación, que también han sido señaladas como la causa del aumento de ROH en regiones específicas, no parecen ejercer ningún efecto sobre su abundancia, apoya la idea anterior. Por último, la variación también fue alta cuando se analizó la distribución genómica de ROH>8Mb y ROH>16Mb. Curiosamente, se encontró que algunas regiones genómicas carecen de ROH largos (por ejemplo, BTA26 y BTA29 para ROH>16Mb). Estos hallazgos pueden sugerir que algunas áreas genómicas no pueden ser afectadas por la endogamia aun a corto plazo.

La distribución desigual de ROH en todo el genoma es especialmente importante, ya que los criadores suelen asociar un aumento del coeficiente de consanguinidad con un efecto perjudicial proporcional (Bjelland y col., 2013; Bjelland y col., 2015). Sin embargo, los efectos fenotípicos de los bloques del ROH vendrán determinados por su localización en el genoma. Hace cuarenta años, Franklin (1977) modeló y determinó la variación esperada en términos de bloques homocigóticos en individuos resultantes de un evento endogámico similar en *D. melanogaster*. En ese estudio, la autora demostró que la probabilidad de encontrar un genotipo homocigótico en una posición específica del genoma después de un evento de endogamia depende de la tasa de recombinación del locus y la longitud del cromosoma. Según la autora, la abundancia de bloques de endogamia debería ser mayor en los cromosomas más largos de 1M, pero la variabilidad debería ser menor en los cromosomas de menos de 0,5M. Para demostrarlo, se analizó la distribución de los ROH recientemente formados (>8Mb y >16Mb) en 12 individuos con el mismo F acumulado en las últimas tres generaciones ($F_{PED3} = 0,125$). Una vez más, los resultados mostraron una distribución desigual en el genoma con una acumulación moderada de ROH sobre loci específicos (hasta nueve ROH>8Mb en algunos loci de BTA24). Además, siete cromosomas

mostraron una ausencia total de ROH>16Mb. A pesar del limitado número de animales, este estudio muestra que los altos niveles de endogamia no siempre conducen a la depresión por endogamia, como también se demostró recientemente en un estudio de ganado aislado en una isla por más de 300 años (Williams y col., 2016). De hecho, incluso el apareamiento de animales no emparentados podría provocar una depresión por consanguinidad si, por casualidad, presentaran ROH largos en algunos loci biológicamente importantes. Además, se demostró que, aunque la acumulación de fragmentos sobre loci específicos no es común, es fácil encontrar ROH largos entre individuos no emparentados. También se demostró que la distribución de los ROH en todo el genoma es generalmente desigual, lo que significa que los efectos fenotípicos de la depresión por consanguinidad pueden variar entre los animales independientemente de su F_{PED} .

Análisis de anotación funcional

El estudio funcional de las regiones genómicas significativamente enriquecidas con ROH constituye un enfoque práctico para identificar posibles vías metabólicas hipotéticamente afectadas por la endogamia. En este trabajo, se realizaron dos análisis separados: uno considerando todos los fragmentos de ROH y otro considerando sólo los ROH recientes. El propósito de esta separación era distinguir los efectos potenciales de la endogamia a corto plazo del resto. Pero, además, en un estudio anterior se sugirió que el análisis de las funciones biológicas afectadas por la endogamia reciente (ROH >8 Mb) era una herramienta más potente que el uso de ROH de menor longitud para analizar la depresión por endogamia (Kardos y col., 2015).

El análisis que incluye todos los ROH detectó un grupo de anotación funcional altamente enriquecido que incluyó varios precursores de la familia *PAG*. Estas proteínas se utilizan como indicadores del estado de preñez, ya que su expresión varía a lo largo de las etapas de la gestación, estando asociadas con la masa de la placenta, el número de fetos y el peso al nacer en el ganado

bovino (Butler y col., 1982; Zoli y col., 1991). En la actualidad, la detección de las proteínas PAG se utiliza como prueba de gestación temprana en ganado vacuno de carne (Roberts y col., 2015) y de leche (Commun y col., 2016; Mayo y col., 2016), y también como como marcador precoz de gestación gemelar (García-Ispuerto y col., 2016). Recientemente, la misma familia de proteínas se ha asociado con la producción de leche, la presencia de enfermedades clínicas (Mercadante y col., 2016), la pérdida de la preñez (Gatea y col., 2018) y la retención de placenta (Hooshmandabbasi y col., 2018). En nuestro estudio, el catabolismo de PAG es la vía significativamente más afectada en los individuos endogámicos, lo que sugiere que la reducción de la fertilidad observada en los toros endogámicos de esta raza (Dorado y col., 2015) podría estar parcialmente mediada por el efecto que produce un semental en el metabolismo de esas proteínas.

En el ganado vacuno, la endogamia también se ha asociado a cambios en el sistema inmunitario (Macedo y col., 2014) y a una mayor incidencia de enfermedades respiratorias (Snowder y col., 2005). Los resultados presentados en este trabajo también identificaron una vía metabólica relacionada con los genes de la *defensina B* afectada por la endogamia. Estas proteínas se han asociado con embriones que mostraban un retraso en su desarrollo al séptimo día después de la inseminación (Beltman y col., 2013) y con vacas que sufren mastitis por estafilococos (Kościuczuk y col., 2014). Los embriones con retraso en el desarrollo suelen ser de baja calidad y menos viables (Hockett y col., 2004; Beltman y col., 2010), así como la mastitis se ha asociado recientemente con una competencia de desarrollo alterada en los ovocitos (Roth y col., 2013), incluso en presentaciones subclínicas (Roth y col., 2016). Ambos casos podrían explicar también, en parte, los mecanismos implicados en la reducción de la fertilidad observada en los individuos consanguíneos (Dorado y col., 2015).

Por otro lado, el análisis de las posiciones genómicas afectadas por los ROH formados recientemente (ROH>8Mb) mostró tres grupos enriquecidos, pero con valor de significancia

menor en comparación con el análisis anterior. El grupo más afectado se asoció con las estructuras de los microtúbulos, el ensamblaje del flagelo, la actividad de la quinasa inositol polifosfato, quimiotaxis y características de unión al ATP. Este grupo incluyó los genes *DNAAF1*, *DNAH1*, *LRR6* y *ZMYND10*. Estos procesos se han relacionado con un ensamblaje axonal alterado de los brazos de dineína que producían un movimiento anormal del flagelo y los cilios (Moore y col., 2013) (Moore y col., 2013; Liu y Luo, 2018). Recientemente, las mutaciones en *DNAH1* han sido fuertemente asociadas con la displasia de la lámina fibrosa del esperma (Sha y col., 2017), varios defectos flagelares y astenozoospermia en humanos (Coutton y col., 2018). Estos hallazgos concuerdan con un estudio anterior que demostró que los toros Retinta altamente endogámicos presentan un aumento de la motilidad con un patrón hiperactivado y un rendimiento reproductivo a campo reducido (Dorado y col., 2015). Por lo tanto, se plantea la hipótesis de que la acumulación de variantes homocigóticas deletéreas a través de eventos de endogamia excesiva puede haber desencadenado esta condición biológica.

Conclusión

En este estudio, se analizó el uso de F_{ROH} como predictor del nivel de endogamia en animales de una población de toros Retinta, algunos de los cuales eran altamente consanguíneos. Se demostró que, aunque el F_{ROH} está correlacionado con el coeficiente de endogamia basado en el pedigrí (F_{PED}), los segmentos ROH se distribuyen de forma desigual entre los individuos con coeficientes F_{ROH} y F_{PED} similares. Además, se encontró que los individuos con una historia reciente de alta endogamia mostraron un mayor número de ROH largos (>8Mb). En esta población, regiones específicas del genoma mostraron una alta acumulación de ROH, que no estuvo asociada a la tasa de recombinación. Los ROH detectados albergaron genes relacionados con proteínas asociadas a la preñez, la motilidad celular, la reorganización del esqueleto y el sistema

inmunitario. Estos resultados concuerdan con un estudio anterior en el que se demostró que algunos de estos toros presentaban un patrón de motilidad aumentado similar a la hiperactivación. Además, se demostró que los animales con el mismo F_{PED} pueden presentar diferentes patrones de ROH, lo que no siempre conlleva un detrimento en el rasgo productivo de interés.

CAPÍTULO 2

La morfometría espermática es afectada por el aumento de la consanguinidad en la raza bovina Retinta: un enfoque molecular

Este capítulo fue publicado como: E. Teran, F. Azcona, M. Ramón, A. Molina, J. Dorado, M. Hidalgo, P. Ross, D. Goszczynski, S. Demyda-Peyrás. Sperm morphometry is affected by increased inbreeding in the Retinta cattle breed: A molecular approach. *Molecular Reproduction and Development*. 2021; 1–11. DOI: 10.1002/mrd.23475.

Introducción

La depresión por endogamia es definida como la reducción de los valores promedios de rasgos fenotípicos relacionados con la reproducción de los individuos (Leroy, 2014). Este efecto es particularmente importante en especies en peligro de extinción (Hinkson y Poo, 2020) y en razas bovinas locales (Rodero Serrano y Molina Alcalá, 2008; Williams y col., 2016) debido a que el número de machos reproductores disponible suele ser reducido. También se ha detectado un aumento de los valores de endogamia en razas ganaderas comerciales de diversas especies como consecuencia del uso intensivo de la transferencia de embriones (Azcona y col., 2019; Perez y col., 2019) y de la reproducción selectiva (Howard y col., 2017), que han disminuido el número de individuos empleados como reproductores.

En el ganado vacuno, el aumento del valor promedio de consanguinidad se ha asociado con efectos fenotípicos negativos, como la reducción de la adaptabilidad al medio ambiente y la longevidad (Sewalem y col., 2006), la salud (Baes y col., 2019), y la producción y composición de la leche (Miglior y col., 1992). Además, la endogamia se ha relacionado en gran medida con una menor eficiencia reproductiva en el ganado vacuno (Doekes y col., 2019), en caballos (Müller-Unterberg y col., 2017; Todd y col., 2020), y en ovejas (Kallweit y Baulain, 2001). A pesar de que los estudios funcionales sobre este tema son escasos, se demostró en un gran número de taxones

que los individuos altamente endogámicos producían esperma con menor motilidad, y por ende, menos viable (van Eldik y col., 2006; Dorado y col., 2015; Santymire y col., 2019; Dini y col., 2020; Doekes y col., 2020). No obstante, la relación entre la endogamia y la morfología del esperma ha sido escasamente evaluada.

Una cuestión importante en relación con la consanguinidad es la precisión de las estimaciones individuales (F). Hasta hace unos años, el coeficiente de endogamia F se calculaba utilizando la información de pedigrí (F_{PED}), a pesar del considerable sesgo que pueden introducir la calidad de los datos utilizados (integridad y precisión del pedigrí) (Hill y Weir, 2011). Hoy en día, las estimaciones genómicas basadas en la información de los genotipos obtenidos de *array* de SNP proporcionan valores de F mucho más fiables, incluso en animales con pedigrí desconocido (Luan y col., 2012; Kardos y col., 2015). En este sentido, el análisis de bloques de homocigosidad (ROH) se ha convertido en el método más avanzado para la evaluación de la consanguinidad durante la última década (Meyermans y col., 2020), siendo la técnica más utilizada en poblaciones de animales domésticos y silvestres (Howard y col., 2017). Además, este tipo de análisis permite la identificación de regiones genómicas con mayor endogamia dentro de un grupo o población concreta, conocidas como islas ROH (*ROH island*, ROHi), que se utilizan para determinar cuáles son los posibles genes y vías metabólicas implicadas en la depresión por endogamia de un determinado carácter (Baes y col., 2019).

El análisis objetivo y preciso de la forma del esperma (análisis morfométrico) es una metodología fiable y comúnmente utilizada para determinar diferencias en la calidad espermática entre especies, razas e individuos (Yániz y col., 2015). Estas variaciones han sido ampliamente asociadas a los procesos de diferenciación entre razas (Soler y col., 2017) y especies (Vicente-Fiel y col., 2013; Martínez y García, 2020), pero también a cambios en la fertilidad (revisado por Maroto-Morales y col. (2016)). Aunque aún no se conoce el mecanismo subyacente a dicha

relación, se ha sugerido que la forma de la cabeza del espermatozoide podría afectar su motilidad en varias especies ganaderas (Malo y col., 2006; Love, 2011; Rubessa y col., 2020), afectando así a su capacidad de alcanzar y penetrar el ovocito (García-Vázquez y col., 2016). Por el contrario, varios estudios comparativos y experimentales no han podido demostrar inequívocamente la relación entre la morfología y la motilidad del esperma, proporcionando resultados contradictorios incluso dentro de los mismos taxones (revisado por Simmons y Fitzpatrick (2012)). En este sentido, Hook y Fisher (2020) plantearon recientemente que la causa de dichas diferencias podría ser la falta de consistencia entre las metodologías y los procedimientos experimentales empleados (en particular los estudios *in vitro*), aun cuando se utilicen análisis CASMA. Del mismo modo, Ramón y col. (2014) demostraron que la caracterización de las propiedades de forma de un espermatozoides en un eyaculado mediante el cálculo de valores promedios no era suficiente para capturar adecuadamente la variabilidad existente en los diferentes parámetros morfométricos entre y dentro de los individuos, disminuyendo así la fiabilidad de los hallazgos. En consecuencia, el análisis morfométrico debería tener en cuenta enfoques más robustos, como la detección de subpoblaciones de espermatozoides (Sp), que ha demostrado ser mucho más informativa en términos de análisis de poblaciones (Roldan, 2020).

Desde hace casi 20 años La forma de la cabeza de los espermatozoides se ha relacionado con la fertilidad en el ganado bovino (Ostermeier y col., 2001). Más recientemente, esta asociación se confirmó utilizando tanto datos de fertilidad de campo (Gravance y col., 2009) como en estudios *in vitro* (Kipper y col., 2017). También el análisis morfométrico se utilizó como una herramienta para determinar la viabilidad del esperma luego de la descongelación (García-Herreros y Leal, 2014). Si bien se ha demostrado un efecto genético en la morfometría espermática, e incluso calculado su heredabilidad en una población de cerca de 300 conejos

Lavara y col. (2013), aún no se han realizado estudios que relacionen la consanguinidad y la morfometría del esperma en el ganado vacuno.

Retinta es una raza bovina autóctona que se cría en rebaños relativamente pequeños en el suroeste de la Península Ibérica, con una representación menor en países como Argentina y Portugal (Morales y col., 2013). La raza se caracteriza por una extrema longevidad y una fertilidad bien conservada, incluso a edades avanzadas. El programa oficial de cría de Retinta no restringe los aumentos de parentesco y relación media entre individuos, lo que favorece la presencia de individuos altamente consanguíneos (Morales y col., 2017). Además, como parte de su plan de mejora, las muestras de semen de los individuos utilizados como reproductores se recogen y congelan de forma estandarizada en un único centro de reproducción, minimizando los factores ambientales que pueden afectar a la calidad del semen tras la descongelación. Todas estas razones hacen que el ganado Retinta sea un modelo interesante para estimar el efecto de la consanguinidad en caracteres espermáticos.

El objetivo de este trabajo fue determinar el efecto del aumento de la consanguinidad sobre la morfometría espermática en la raza bovina Retinta española. Para ello, empleamos un enfoque combinado que incluía CASMA y el análisis molecular de bloques de homocigosidad individuales y las vías genómicas presuntamente implicadas.

Materiales y métodos

Muestras

Se analizaron muestras de esperma de 57 toros pertenecientes al programa de IA de la Asociación Española de Criadores de Retinta. Las muestras se recogieron y congelaron durante 10 años siguiendo los procedimientos estándar de extracción de semen de vacuno de carne del

centro andaluz de reproducción animal (CENSYRA-Centro de Selección y Reproducción Animal). En resumen, el semen se obtuvo mediante el método de obtención de semen por vagina artificial en presencia de vacas con celo inducido. Sólo se procesaron los espermatozoides con una motilidad adecuada (motilidad masal > 4). Tras la recolección, los espermatozoides se diluyeron en medio AndroMed®, se dosificaron en pajuelas de 0,25 ml y se equilibraron durante 4 horas a 4°C. Finalmente, las pajuelas se congelaron en una máquina automática Planer Kryo III (Telstar®) en una rampa de congelación de tres pasos, como sigue: Paso 1: de 4 a -10°C a -5°C/min; Paso 2: -10 a -100°C a -40°C/min; Paso 3: -100 a -140°C a -20°C/min. Tras la congelación, las pajuelas se sumergieron en N₂ líquido y se almacenaron en el criobanco CENSyRA.

Obtención de ADN y genotipado de animales

Las muestras de ADN se obtuvieron de las mismas dosis de esperma congeladas utilizando el kit de purificación de ADN genómico de tejidos HigherPurity™ (Canvax Biotech). Posteriormente, los individuos fueron genotipados utilizando el chip de SNP de alta densidad Axiom Genome-Wide BOS 1 Bovine (Thermo Fisher Scientific), siguiendo las instrucciones del fabricante. Los genotipos se asignaron utilizando el software Axiom™ Analysis Suite V 4.0 (Thermofisher), estableciendo un umbral de *call rate* por individuo y SNP de 0,95 y el filtro DQC (*Design Quality Control*) de 0,97. No se aplicó un filtrado de frecuencia del alelo menor (MAF), ya que podría sesgar las estimaciones de la endogamia genómica individual en SNP-arrays de alta densidad (Meyermans y col., 2020). Tras el procesamiento inicial, se retuvieron 624.737 marcadores para su análisis posterior.

Caracterización de ROH y coeficiente de endogamia basado en ROH (F_{ROH})

Se determinaron los ROH por individuo utilizando el algoritmo de "*consecutive.runs*" de la librería detectRUNS (Marras y col., 2015) implementado en R. Se utilizó una longitud mínima

de ROH de 1Mb, para evitar la detección de ROH derivados de la herencia de haplotipos alocigóticos comunes (Kim y col., 2015), y se establecieron cinco categorías de longitud independientes (1-2, 2-4, 4-8, 8-16 y >16 Mb). El número de genotipos heterocigotos (nH) y nulos (nM) permitidos se estableció por categoría, utilizando las siguientes fórmulas:

$$nH = \frac{mL}{dS} \times eG$$

$$nM = \frac{mL}{dS} \times mG$$

donde mL es la longitud media de los ROH, dS es la distancia media entre los SNP, eG es la tasa de error de genotipado (fijada en un 0,25% según los procedimientos estándar de Axiom™), y mG es la tasa promedio de genotipos nulos en la población (Tabla Suplementaria 1). A continuación, los ROH con regiones superpuestas dentro del mismo individuo se unieron utilizando la función “*reduce*” de la librería de *GenomicRanges* (Lawrence y col., 2013) del entorno R. Finalmente, los F_{ROH} se calcularon como el porcentaje de la longitud del genoma cubierto por fragmentos de ROH tanto en el total del genoma de cada individuo como a nivel de cada uno de sus cromosomas independientemente.

Agrupamiento de animales

A fines experimentales, los animales se agruparon en dos grupos en función del valor de F_{ROH} utilizando como umbral el valor teórico obtenido de un apareamiento de medios hermanos ($F = 0,125$): de alta endogamia (AE, $n = 21$; media $F_{ROH} = 0,174$, rango de 0,01 a 0,125) y de baja endogamia (BE; $n = 36$; F_{ROH} medio = 0,053, rango de 0,131 a 0,29).

Análisis de morfometría espermática

Preparación y tinción de los espermatozoides

Se analizaron dos pajuelas congeladas (de dos eyaculados diferentes) por toro (n = 57). Las muestras se descongelaron en un baño de agua a 37°C durante 30 s, se diluyeron 1:1,5 [v/v] en solución salina tamponada con fosfato (PBS), se extendieron en un portaobjetos y se secaron al aire durante 30min. A continuación, los espermatozoides se tiñeron con Diff-Quik® (Medium Diagnostics AG) y se secaron a temperatura ambiente durante 24 h siguiendo nuestro protocolo estándar (Hidalgo y col., 2006). Por último, se sellaron dos portaobjetos por individuo con tres gotas de medio de montaje Eukitt® utilizando un cubreobjetos, se secaron a temperatura ambiente durante 24 h y, posteriormente, se mantuvieron a 4°C en una caja oscura hasta su análisis.

Análisis morfométrico asistido por computadora (Computer assisted sperm morphometric analysis, CASMA)

Se analizaron las cabezas de cien espermatozoides capturados aleatoriamente por cada muestra utilizando el módulo morfológico del Sperm Class Analyzer (SCA v 5,4, Microptic SL) en un microscopio Olympus BH-2 (Olympus). Sólo se analizaron cabezas normales (Fordyce y col., 2006) y no superpuestas (no más de dos por campo) a un aumento de 60x. En cada célula, CASMA determinó cuatro medidas diferentes: longitud (L, μm), ancho (W, μm), área (A, μm^2) y perímetro (P, μm), a partir de las cuales se estimaron tres parámetros no dimensionales adicionales: elipticidad (ELI; L/W), la elongación (ELO; $(L-W)/(L + W)$) y el factor de forma perímetro-área ($p2a$; $P^2/4 \times \pi \times A$).

Análisis estadístico de los resultados de CASMA entre y dentro de los grupos

Las diferencias entre los grupos de consanguinidad (AE y BE) en cada parámetro evaluado se analizaron estadísticamente mediante un modelo lineal generalizado (GLM), incluyendo el grupo de consanguinidad (2 niveles), el año de recolección (10 niveles) y la réplica (2 niveles) como factores fijos y el toro como factor aleatorio. Dicho modelo fue determinado en función al criterio de información de Akaike. Además, la variación atribuida a cada efecto se determinó mediante la estimación de máxima verosimilitud restringida (REML) de los componentes de la varianza. Las diferencias de variabilidad dentro de los grupos se compararon mediante la prueba de homogeneidad de varianzas de Hartley-Cochran-Bartlett. Por último, el coeficiente de variación (CV) de cada parámetro se comparó entre grupos mediante la prueba de cociente de probabilidades con signo (SLRT) según Krishnamoorthy y Lee (2013).

Evaluación de Subpoblaciones (Sp) espermáticas

En un análisis posterior, los espermatozoides se agruparon en Sp (dentro de cada grupo) utilizando el procedimiento descrito por Martínez-Pastor y col. (2005). Inicialmente, se realizó un análisis de componentes principales (PCA), en el cual se determinaron las variables que mejor explicaban la variabilidad de los datos, en este caso se escogieron el área de la cabeza del espermatozoide y el p2a por presentar mayor *eigenvalue* en los primeros tres componentes. A continuación, se realizó el procedimiento de agrupación no jerárquica mediante el criterio del Ancho Medio de la Silhouette (SAW) (Rousseeuw, 1987). Para determinar el número final de *clusters* en el análisis jerárquico, se tuvieron en cuenta dos criterios: el coeficiente Γ de Hubert (Halkidi y col., 2002) y el método L (Salvador y Chan, 2004) (El coeficiente Γ de Hubert mide el nivel de similitud de la estructura de *clusters*, de modo que cuanto mayor sea el valor, mejor es la estructura de *cluster*. Se utilizó el método L debido a su simplicidad. Este método determina el número óptimo de conglomerados basándose en métodos gráficos mediante la búsqueda de la "rodilla", es decir, el punto de máxima curvatura en un gráfico de evaluación que crea el algoritmo

de agrupación y que representa el número de *clusters* frente a la distancia de unión. Finalmente, se asignaron espermatozoides a cada conglomerado. Para cada muestra de esperma, se obtuvo el porcentaje de espermatozoides pertenecientes a cada *cluster* (Sp). Finalmente, se compararon los porcentajes de cada Sp entre grupos AE y BE mediante la prueba Z de proporciones. Todos los análisis se realizaron en la plataforma estadística R.

Análisis funcional de ROHi

Seguidamente, se evaluó el efecto de la endogamia sobre las funciones biológicas asociadas a morfometría espermática realizando un análisis funcional de ROHi determinados en el grupo de toros altamente consanguíneos. En primer lugar, se identificaron posiciones estadísticamente enriquecidas con ROH mediante una prueba de permutación, bajo la hipótesis nula de que los ROH están distribuidos por igual en el genoma, comparando un millón de veces el número real de ROH en cada locus con un valor aleatorio tomado de la población. A continuación, se calculó un valor de significancia (p) por locus como el número de veces que el número aleatorio era mayor que el número observado. Posteriormente, se eligieron las regiones genómicas en ROH con una distancia mínima de 1Mb y una significancia $p < 0,01$. Estas regiones en AE y BE fueron convertidas en objetos *GRanges* e intersectadas utilizando la librería *IRanges* (Lawrence y col., 2013). Por último, todos los genes localizados en esas regiones ROHi en AE pero no en BE fueron obtenidos desde el genoma de referencia ARS-UCD1.2 *Bos taurus* (Rosen y col., 2020).

Selección de genes candidatos

Los genes candidatos fueron seleccionados entre los localizados dentro de las ROHi tras una exhaustiva revisión bibliográfica de las investigaciones existentes sobre los procesos de espermatogénesis en mamíferos. En primer lugar, se seleccionaron los genes significativamente afectados por endogamia ($p < 0,05$) mediante una prueba de permutación. Seguidamente, se

determinaron sus funciones más conocidas utilizando la información disponible en *NCBI Reference Sequence* (O'Leary y col., 2016) y *Gene Ontology* (The Gene Ontology Consortium, 2019). Finalmente, se analizaron y discutieron sólo aquellos genes previamente relacionados con los procesos de desarrollo del esperma en los mamíferos.

Resultados

Caracterización de ROH

Las diferencias en los valores de F_{ROH} entre grupos (AE, $0,174 \pm 0,04$; BE, $0,053 \pm 0,04$, $p < 0,001$) se explicaron principalmente por la abundancia de ROH (AE, $202,37 \pm 67,11$ fragmentos; BE, $69,87 \pm 42,38$ fragmentos; $p < 0,001$), así como por su longitud media (AE, $3,678 \pm 0,093$ Mb; BE, $2,128 \pm 0,065$ Mb).

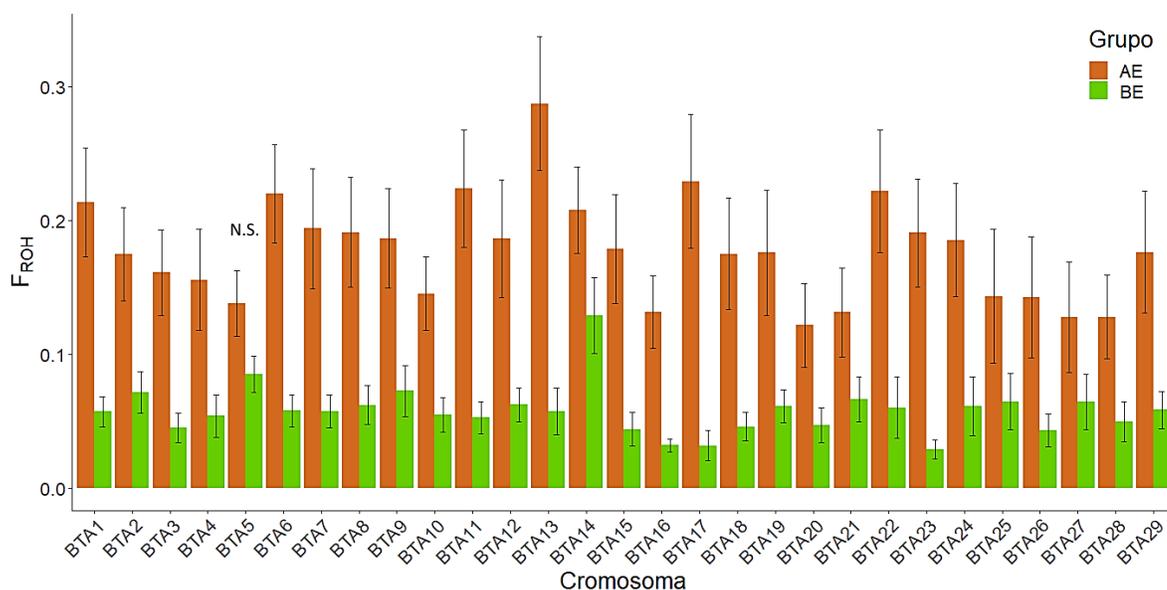


Figura 1. Distribución de F_{ROH} en individuos de la raza Retinta con baja consanguinidad (BE) y altamente consanguíneos (AE) por cromosoma. F_{ROH} se expresa como la fracción del cromosoma afectado. N.S.: No significativo

Además, los valores de F_{ROH} fueron significativamente diferentes entre los cromosomas dentro de los grupos ($p < 0,01$, Figura 1), así como a nivel cromosómico (sólo BTA5 mostró valores similares en AE y BE).

Morfometría espermática

No se observaron diferencias significativas entre los grupos en los valores promedios ni CV en ninguno de los parámetros analizados (Tabla 1, $p > 0,05$). Cerca del 70% de la variabilidad observada en los cuatro rasgos directos (L, W, P y A) se explicó por el efecto intra-individual, mientras que el 30% restante se atribuyó principalmente a la variación entre toros (Figura 2, $p < 0,05$), con sólo un 3% de la variación explicada por la réplica.

Tabla 1. Estadística básica de los datos de morfometría espermática en toros Retinta de alta (AE) y baja (BE) consanguinidad

Parámetro	Grupo Endogámico			
	Alta Endogamia (AE)		Baja Endogamia (BE)	
	Media \pm SD	CV (%)	Media \pm SD	CV (%)
Longitud (μm)	10,85 \pm 0,37	3,55	10,78 \pm 0,32	2,99
Ancho (μm)	5,34 \pm 0,18	3,39	5,28 \pm 0,23	4,17
Área (μm^2)	47,41 \pm 2,67	5,65	46,5 \pm 2,92	6,25
Perímetro (μm)	28,12 \pm 0,90	3,21	27,87 \pm 0,87	3,10
Elongación	0,34 \pm 0,02	4,63	0,34 \pm 0,01	4,73
Elipticidad	2,03 \pm 0,07	3,55	2,05 \pm 0,08	3,54
Factor de forma perímetro-área	1,33 \pm 0,02	1,60	1,33 \pm 0,02	1,56

Nota: No se observaron diferencias entre los grupos ($p > 0,05$). Abreviatura: CV, coeficiente de variación, expresado en porcentaje.

El análisis de agrupamiento demostró la existencia de cuatro Sp de espermatozoides bien diferenciadas (Tabla 2, Figura S1). Mientras que Sp1 y Sp4 incluían los espermatozoides de cabeza

Tabla 2. Características morfométricas de las cabezas espermáticas por subpoblación identificadas en toros Retinta.

Parámetro	Subpoblación espermática (Sp)			
	Sp1 (N = 1723; 16%)	Sp2 (N = 4018; 38%)	Sp3 (N = 1161; 11%)	Sp4 (N = 3720; 35%)
Longitud (μm)	11,08 \pm 0,31 ^c	10,47 \pm 0,34 ^b	10,22 \pm 0,33 ^a	11,27 \pm 0,37 ^d
Ancho (μm)	5,7 \pm 0,15 ^d	5,34 \pm 0,18 ^c	4,85 \pm 0,15 ^a	5,27 \pm 0,22 ^b
Área(μm^2)	51,55 \pm 1,75 ^d	45,82 \pm 2,17 ^b	40,66 \pm 1,51 ^a	48,42 \pm 2,87 ^c
Perímetro (μm)	29,02 \pm 0,58 ^d	27,35 \pm 0,72 ^b	26,22 \pm 0,62 ^a	28,87 \pm 0,86 ^c
Elongación	0,32 \pm 0,02 ^a	0,32 \pm 0,02 ^b	0,35 \pm 0,02 ^c	0,36 \pm 0,02 ^d
Elipticidad	1,94 \pm 0,08 ^a	1,96 \pm 0,09 ^b	2,11 \pm 0,11 ^c	2,14 \pm 0,1 ^d
Factor de forma	1,3 \pm 0,02 ^a	1,3 \pm 0,02 ^a	1,35 \pm 0,03 ^b	1,37 \pm 0,03 ^c
perímetro-área				

Nota: Los diferentes superíndices indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre la media de cada variable por subpoblación (ANOVA). Sp1: cabezas espermáticas grandes y redondeadas. Sp2: cabezas espermáticas pequeñas y redondas. Sp3: cabezas espermáticas pequeñas y alargadas. Sp4: cabezas espermáticas grandes y angostas.

más grande (Figuras 3A y 3D, respectivamente), Sp2 incluía los espermatozoides de cabeza intermedia y Sp3 los más pequeños (Figura 3B y C, respectivamente). En cuanto a la forma, Sp1 y Sp2 tenían espermatozoides con cabezas más redondas, claramente evidenciadas por el menor valor de p_{2a} , mientras que Sp3 y Sp4 las tenían más estrechas. El análisis de los grupos AE y BE

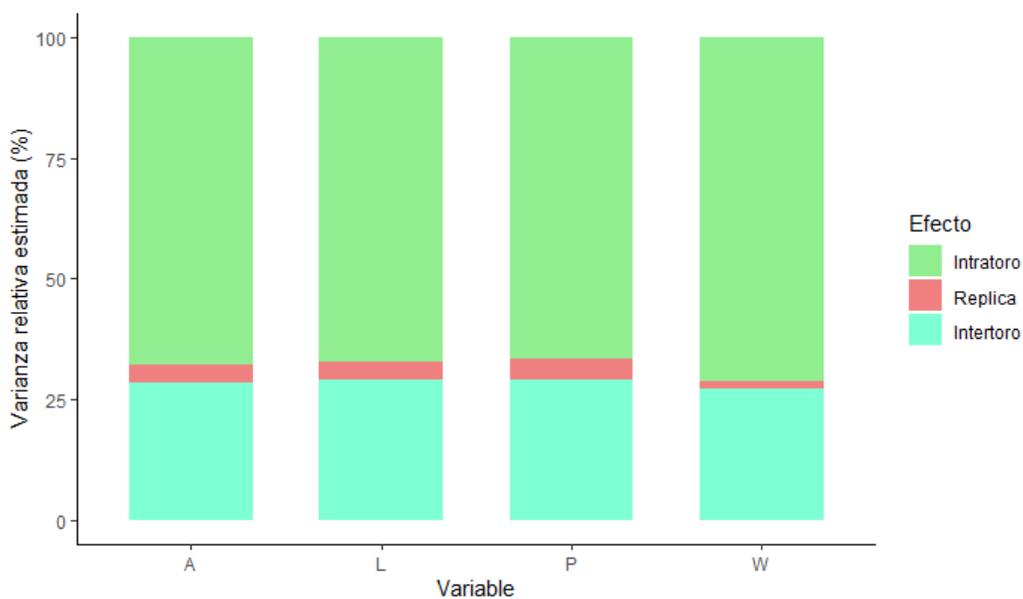


Figura 2. Porcentaje de los componentes de la varianza dentro del toro, entre réplicas y entre toros de la raza Retinta. Cada barra representa una variable diferente. A, área; L, longitud; P, perímetro; W, ancho.

mostró un patrón diferencial de Sp (Tabla 3), de modo que, el grupo BE tuvo un mayor porcentaje de espermatozoides de cabeza redonda tanto grandes (Sp1) como pequeños (Sp2), mientras que el grupo AE presentó un mayor porcentaje de cabezas de espermatozoides pequeñas y alargadas (Sp3) ($p < 0,05$; Tabla 3).

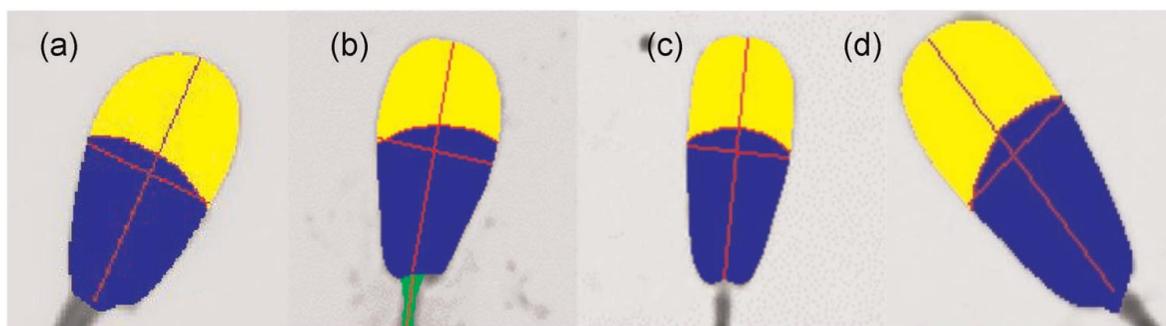


Figura 3. Esquemas de subpoblaciones espermáticas en una población de Retinta, detectados por el análisis de clasificación. (a) Sp1, cabeza de espermatozoides grande y redonda. (b) Sp2, cabeza de espermatozoides pequeña y redonda. (c) Sp3, cabeza de espermatozoides pequeña y alargada. (d) Sp4, cabeza de espermatozoides grande y estrecha.

Tabla 3. Distribución de las subpoblaciones morfométricas de esperma en toros Retinta de alta (AE y baja (BE) endogamia.

Subpoblación	Grupo endogámico		Total (N)
	BE (%) N=6724	AE (%) N=3898	
Sp1	16,78 ^b	15,26 ^a	1723
Sp2	39,21 ^b	35,43 ^a	4018
Sp3	8,51 ^a	15,11 ^b	1161
Sp4	35,50 ^b	34,20 ^a	3720
Total (N)	6724	3898	10622

Nota: Las subpoblaciones se expresan como porcentaje del recuento total de espermatozoides. Diferentes superíndices denotan diferencias significativas (Z-test, $p < 0,05$).

Regiones genómicas diferencialmente afectadas por la endogamia

En total, se detectaron 65 ROHi en el análisis inicial (29 en AE y 36 en BE). Tras eliminar las regiones comunes, sólo quedaron 23 de AE para el análisis posterior, que representaron 29,04 Mb (1,07%) del total del genoma, las cuales contenían 148 genes codificantes localizados en 13 cromosomas diferentes (Tablas Suplementarias 2 y 3). Teniendo en cuenta los valores de p , siete genes fueron los más afectados ($p < 0,001$), existiendo además un grupo adicional de 22 genes que estaba menos afectado ($p < 0,01$), mientras que el resto de genes ($n=146$) estaban afectados en menor medida ($p < 0,05$, Tabla Suplementaria 3). Cuatro de los genes altamente afectados ($p < 0,01$) fueron seleccionados como candidatos debido a su relación previa con los procesos de espermatogénesis en mamíferos (Tabla 4). Además, dos genes del último grupo ($p < 0,05$) fueron seleccionados debido a su relación demostrada con la forma del esperma en modelos de mamíferos.

Tabla 4. Genes afectados diferencialmente en los grupos de baja (BE) y alta (AE) consanguinidad del ganado Retinta previamente relacionados con la espermatogénesis en mamíferos.

Símbolo del gen	Nombre del gen	Cromosoma	p promedio	Referencias
SPAG6	<i>Sperm associated antigen 6</i>	BTA13	0,00329	(Liu y col., 2019)
ARMC3	<i>Armadillo repeat containing 3</i>	BTA13	0,00307	(Pausch y col., 2016)
PARK7	<i>Parkinsonism associated deglycase</i>	BTA16	0,00080	(Wang y col., 2018)
VAMP3	<i>Vesicle-associated membrane protein 3</i>	BTA16	0,00082	(Tsai y col., 2010; Sun y col., 2014)
DYNLRB2	<i>Dynein light chain roadblock-type 2</i>	BTA18	0,01496	(Shojaei Saadi y col., 2013)
PHF7	<i>PHD finger protein 7</i>	BTA22	0,01496	(Zhang y col., 2017; Wang y col., 2019)

Discusión

Si bien la endogamia se ha relacionado con una reducción de la fertilidad en mamíferos, su relación con los cambios en la forma del esperma apenas se ha evaluado. En el presente estudio se analizó el efecto del aumento de la consanguinidad sobre los rasgos morfométricos del esperma en muestras de ganado autóctono español de la raza Retinta, combinando la detección de valores de endogamia basados en datos genómicos con determinaciones objetivas de la morfometría espermática (CASMA).

La endogamia no afecta los valores morfométricos promedios del esperma

No se observaron diferencias en los valores promedios y de dispersión (C.V.: Coeficiente de Variación) entre los animales altamente endogámicos y aquellos con baja endogamia. Estos

resultados son opuestos a los comunicados por Lawrence y col. (2017) que, en uno de los pocos estudios experimentales realizados sobre el tema, encontraron una pequeña correlación positiva entre el alargamiento medio de la cabeza de los espermatozoides y el aumento de la endogamia en los lobos rojos (*Canis rufus*). Por el contrario, los mismos autores no encontraron ninguna relación entre la endogamia y los rasgos morfométricos medios en muestras de esperma de otro mamífero (hurón de patas negras; *Mustela nigripes*), lo que coincide con los hallazgos de nuestro trabajo. Sin embargo, en ambos estudios los resultados deben tomarse con precaución debido al pequeño número de cabezas de esperma analizado por individuo ($n = 10$) y a la falta de réplicas. En este sentido, el presente estudio ha analizado cerca de 100 espermatozoides de dos muestras diferentes por individuo, lo que está más cercano al número de espermatozoides necesario para obtener resultados fiables, según la reciente revisión de Hook y Fisher (2020). Aun así, la falta de diferencias observadas podría deberse en parte a que los valores promedios de las dimensiones espermáticas (como estimaciones de la forma del esperma) no constituyen una buena representación de la variabilidad espermática existente entre y dentro de los individuos (Roldan (2019)) lo que enmascararían las pequeñas variaciones existentes entre grupos.

En el ganado vacuno, Beletti y col. (2005) y Ntemka y col. (2016) encontraron una influencia genética en la morfología del esperma entre subespecies y razas. Este hecho también se observó en varias especies, en particular en los taxones en los que la competencia espermática tras el apareamiento era baja, lo que apoya la idea de que el efecto del genotipo en los rasgos de morfometría espermática debería determinarse específicamente para cada raza y especie (Simmons y Fitzpatrick, 2012). Por el contrario, estudios comparativos han encontrado que los espermatozoides son menos variables en términos de morfología en especies donde el nivel de competencia espermática es mayor (Blengini y col., 2014). Este no es el caso de los bovinos, ya

que los toros dominantes tienden a impedir el apareamiento múltiple mediante estímulos visuales y olfativos (Chenoweth, 1983).

Los resultados de este trabajo mostraron que la mayor variación se observó dentro de los individuos, más que entre ellos. Esta diferencia podría estar asociada a cambios en la estabilidad y el empaquetamiento de la cromatina (Sailer y col., 1996), también relacionados con un aumento de la endogamia. Sin embargo, también se han descrito diferencias en la protaminación de los espermatozoides (Gosálvez y col., 2011), así como en la formación de microtúbulos y centriolos, como responsables en parte de la conformación de las cabezas de los espermatozoides durante la espermatogénesis (Renkawitz-Pohl y col., 2005). Estas diferencias podrían producirse por la expresión genotípica de cada espermátida haploide, particularmente durante su diferenciación celular en los pasos finales de la espermatogénesis.

Variaciones dentro y entre muestras

Curiosamente, la mayor parte de la variación observada se explica por el componente intra-individual, seguido de la variación entre individuos (moderada) y entre eyaculados (sólo el 3%). Boersma y col. (1999) reportaron resultados similares en muestras de esperma de *Bos taurus* antes de la congelación, así como también, Maroto-Morales y col. (2012) y Ramón y col. (2013) en carneros y ciervos, respectivamente. En ambos casos, los autores especularon que este fenómeno podría ser una estrategia evolutiva para aumentar el rendimiento reproductivo de los machos. Por el contrario, Pitnick y col. (2009) afirmaron que la variación dentro de la muestra estaba limitada por adaptaciones testiculares para mantener un entorno homeostático que favoreciera un adecuado desarrollo de los espermatozoides primordiales, pero que también podría estar limitada como resultado de una fuerza estabilizadora dentro de las especies bajo un intenso efecto de selección. En este sentido, aunque CASMA es probablemente la mejor metodología objetiva para

evaluar la morfometría espermática a nivel poblacional, debido a la cantidad y calidad de los datos generados (Hook y Fisher, 2020), nuestros resultados reafirman la idea de que estos deben ser analizados con análisis estadísticos que tengan en cuenta la variabilidad intra-individual y la arquitectura propia de las subpoblaciones, en lugar de la comparación de valores promedios entre individuos, para obtener conclusiones más fiables.

Efecto de la endogamia en Sp

La principal ventaja de estudiar el esperma agrupando en Sp es la posibilidad de determinar diferencias entre grupos a nivel poblacional (Maroto-Morales y col., 2016). Este fue el caso del presente estudio, ya que se detectaron diferencias entre los toros de alta y baja endogamia que no fueron detectados utilizando los valores promedios. En este sentido, los espermatozoides con cabezas estrechas se incrementaron en los toros endogámicos, especialmente los pequeños (Sp3), mientras que los espermatozoides de cabeza redonda, tanto grandes (Sp1) como pequeños (Sp2) se encontraron con más frecuencia en los individuos BE. Estas formas estrechas y más hidrodinámicas se asociaron no sólo con espermatozoides más propensos a progresar por el tracto femenino (Malo y col., 2006) sino también con una mayor capacidad de nado en aves (Støstad y col., 2018) y caballos (Křížková y col., 2017). Estos hallazgos concuerdan con una caracterización cinemática previa de toros Retinta que mostraba que los espermatozoides de individuos endogámicos se movían más rápido y eran menos fértiles (Dorado y col., 2015). Por el contrario, Chen y col. (2019) asociaron recientemente un aumento de p2a con una disminución de la motilidad espermática en seres humanos. Esta discordancia podría sugerir la existencia de mecanismos adicionales que pueden limitar el efecto de la morfometría espermática sobre la motilidad. Sin embargo, hasta la fecha no se habían realizado asociaciones previas entre la endogamia y Sp espermáticas. En este sentido, este trabajo refuerza la idea que el efecto de la

endogamia en los espermatozoides debe ser analizado sobre una base especie-específica y utilizando metodologías robustas, como puede ser la determinación de Sp espermáticas.

Distribución de la endogamia molecular entre grupos

En acuerdo con los resultados descritos en el capítulo anterior de esta tesis, los ROHi no se distribuyeron uniformemente entre los cromosomas dentro y entre los grupos. Este aumento irregular de la consanguinidad en algunas regiones específicas también se asoció recientemente con una reducción de la fertilidad en las vacas Ayrshire finlandesas (Martikainen y col., 2018) y en los toros Holstein estadounidenses (Nani y Peñagaricano, 2020). Teniendo en cuenta que los ROHi podrían verse afectados de forma diferencial entre razas por presiones selectivas naturales (ambientales) y artificiales (antrópicas), así como por la deriva génica y eventos de cuello de botella (Mastrangelo y col., 2018; Dixit y col., 2020), las comparaciones entre estudios deben hacerse con precaución. En este trabajo se evaluaron las diferencias en los patrones de homocigosidad entre individuos agrupados solo por diferencias en los valores de endogamia, pero todos ellos con la mismo base genética e historial de selección. Esto, junto con la falta de efectos ambientales (como centro de recolección y la réplica) permitió realizar una detección más refinada de los posibles genes y mecanismos que asocian la endogamia y la forma del esperma.

Detección de genes presumiblemente involucrados en la morfometría espermática

El análisis funcional reveló cuatro genes candidatos altamente influenciados por el aumento de la endogamia. Los dos genes más afectados (*PARK7* y *VAMP3* en BTA16, $p < 0,0001$) se han asociado previamente con la espermatogénesis y la maduración de los espermatozoides en modelos de ratón (Sun y col., 2014; Wang y col., 2018) y de pollo (Zhang y col., 2017). De ellos, *PARK7* se asoció más con la función mitocondrial que con la forma de la cabeza de los espermatozoides en ratas y humanos (Sun y col., 2014; Wang y col., 2018), lo que sugiere que su

papel en el proceso reproductivo estaría más relacionado con la motilidad que con la morfometría. En el caso de *VAMP3*, que codifica una proteína con una función clave durante la formación del acrosoma y la capacitación a través del desarrollo de complejos ternarios trans-SNARE, se encontró además que modulan la forma del espermatozoide en un modelo porcino (Tsai y col., 2010). Dos genes adicionales relacionados con la estructura interna del flagelo en mamíferos (*AMRC3* y *SPAG6* en BTA13) (Pausch y col., 2016) también se vieron afectados por la endogamia, aunque en menor medida ($p < 0,01$). *SPAG6* se asoció recientemente con varios pasos de codificación de proteínas durante la biogénesis acrosomal en ratones (Liu y col., 2019), lo que sugiere una posible implicancia en la forma de la cabeza del espermatozoide. Por último, otros dos genes (*DYNLRB2* (BTA18) y *PHF7* (BTA22)) del grupo que se vieron menos afectados por la endogamia ($p < 0,05$) también habían sido previamente relacionados con la forma de la cabeza del espermatozoide. Así, *PHF7* se asoció con cambios en la reacción acrosómica de los espermatozoides mediante la modificación de la ubiquitinación de la histona H2A en el proceso de elongación de espermátidas durante los pasos finales de la espermatogénesis (Wang y col., 2019). Del mismo modo, se observó una disminución en la expresión de *DYNLRB2* en espermatozoides piriformes de toros Holstein, causando cambios estructurales en el citoesqueleto de la célula (Shojaei Saadi y col., 2013).

Aunque en este estudio no se realizó una validación funcional de esos genes, el hecho de que todos ellos se vieran afectados de forma diferencial por el aumento de la consanguinidad en toros con diferentes proporciones de *Sp* espermáticas puede indicar su implicancia en la variación de los rasgos morfométricos del espermatozoide. Se necesitan más estudios para validar estos resultados y obtener una comprensión más detallada de los mecanismos implicados.

Conclusión

Se determinó, por primera vez, el efecto de la endogamia sobre la forma de la cabeza del esperma en el ganado bovino Retinto mediante técnicas objetivas. Los resultados demostraron que la endogamia modificó la estructura de las Sp espermáticas, sin afectar a los valores promedios. A pesar de la gran variación intra-individual detectada, el esperma de los individuos altamente endogámicos tuvo una tendencia a ser más estrecho en comparación con el grupo de menor endogamia. Finalmente, se detectaron regiones genéticas específicas afectadas diferencialmente por la endogamia, algunas de las cuales incluían genes previamente relacionados con la espermatogénesis. Dado que no se realizó ninguna validación funcional, futuros estudios podrían determinar hasta qué punto estos mecanismos están involucrados en el control de los rasgos morfométricos del esperma en el ganado.

CAPÍTULO 3

Estudio del efecto de la endogamia molecular en el patrón de subpoblaciones espermáticas motiles en tres razas bovinas

Introducción

Consanguinidad molecular

El nivel de consanguinidad molecular, que se determina en base a marcadores genómicos SNP, se puede estimar a partir del análisis de *Runs of Homozygosity* (ROH). Debido a la naturaleza estocástica del proceso de formación de las gametas, los ROH se distribuyen de manera parcialmente aleatoria a lo largo del genoma. Sin embargo, existen regiones más propensas a acumular ROH, denominadas islas de ROH (*ROH island*, ROHi), en las cuales, el porcentaje de este tipo de fragmentos es significativamente alto en un grupo de individuos en comparación con el resto de la población. Se han propuesto varias teorías para intentar explicar su origen, siendo una de las más aceptadas la de la selección artificial de alelos en *loci* asociados a caracteres cuantitativos (QTL) (Szmatoła y col., 2016), que una vez establecidos, se mantienen estables principalmente debido a su ventaja fenotípica. Además, pueden encontrarse ROHi en regiones del genoma asociados a procesos biológicos de mayor importancia, que poseen bajas tasas de recombinación (Gibson y col., 2006; Bosse y col., 2012; Peripolli y col., 2018). Alternativamente, Curtis y col. (2008) plantearon que la acumulación de ROH en ciertas regiones podría deberse a pequeñas inversiones que suprimen la recombinación y no así a un proceso selectivo. Sin embargo, el análisis realizado en el capítulo 1 de esta tesis determinó que la acumulación de ROH no se encontraba correlacionada con la tasa de recombinación existente en cada posición del genoma, sugiriendo más bien que dichas regiones enriquecidas en ROH se podrían haber producido por selección. En el capítulo 1, se demostró que esta acumulación podría explicar la depresión endogámica en ciertos caracteres, ya que, los ROH que se encontraron significativamente enriquecidos en el grupo de alta consanguinidad afectaron genes relacionados

con calidad espermática (Goszczyński y col., 2018). Por lo tanto, si bien la acumulación de ROH en ciertas regiones podrían indicar depresión endogámica, también podrían haberse acumulado como consecuencia de procesos de selección, asociados a patrones característicos de cada raza (Peripolli y col., 2018; Cortes-Hernández y col., 2022). Por tal motivo, nuestro análisis incluye tres razas seleccionadas con diferente fin: una raza autóctona caracterizada por altos niveles de consanguinidad y alta fertilidad, una raza de propósito lechero y una raza de propósito de carne.

Detección de segmentos HBD (Homozygous by Descent)

Existen dos metodologías diferentes para detectar la presencia de ROH en una posición dada del genoma de un individuo: 1) los métodos observacionales, que escanean el genoma en busca de segmentos de SNP homocigotos consecutivos hasta que se cumple una condición dada (por ejemplo, un número mínimo de SNP homocigotos consecutivos, una máxima distancia entre dos SNP homocigotos consecutivos y un número máximo de SNP heterocigotos y/o nullos permitidos); y 2) los métodos basados en modelos probabilísticos (como el modelo oculto de Markov), que estiman la probabilidad de que un marcador se encuentre en homocigosis por azar, comparándola con la frecuencia de ocurrencia real. El primero de ellos puede implementarse escaneando linealmente el genoma marcador por marcador, de manera continua (*consecutive runs*, implementado en la librería *DetectRUNS* (Marras y col., 2015) en R), o bien mediante ventanas deslizantes, donde la lectura se realiza en grupos de SNP incluidos dentro de una ventana que se desliza secuencialmente hasta que infringe alguna de las condiciones preestablecidas (implementado en el *software* PLINK). Por el contrario, los métodos probabilísticos han sido implementados recientemente en la librería *RZooRoH* (Bertrand y col., 2019) en R. Estos últimos modelos son más informativos ya que permiten distinguir los segmentos idénticos por descendencia HBD (*Homozygous by Descent*) de los idénticos por estado (HBS: *Homozygous by State*) (Druet y Gautier, 2017), y, además, tienen en cuenta la frecuencia alélica de los marcadores,

la distancia genética y los errores de genotipado, lo cual aumentaría la precisión de las estimaciones.

Depresión endogámica por cromosoma y longitud

La depresión fenotípica causada por la endogamia ha sido estudiada tanto en caracteres productivos como en reproductivos (Mc Parland y col., 2007; Antonios y col., 2021; Lozada-Soto y col., 2021). Aunque tradicionalmente su aparición ha sido asociada al aumento del valor del coeficiente de consanguinidad del genoma completo (Forneris y col., 2021; Lozada-Soto y col., 2021), algunos trabajos más recientes presentaron otro enfoque, planteando la existencia de depresión endogámica en cromosomas específicos. En este sentido, Martikainen y col. (2018) detectaron depresión endogámica para caracteres reproductivos de vacas lecheras asociada a cuatro cromosomas específicos. Sin embargo, Laseca y col. (2022) demostraron que el valor del coeficiente de endogamia global explicaba mejor la depresión endogámica en la fertilidad en yeguas que la endogamia en cromosomas específicos, y que, si bien existen cromosomas con un mayor efecto que otros, la influencia a nivel cromosómico podría estar enmascarada por la diversidad de locus afectando el mismo carácter en distintos cromosomas.

La longitud de los ROH está inversamente relacionada con la generación en la cual se produjo el evento endogámico. Por ende, los ROH más largos serían el resultado de eventos endogámicos recientes, mientras que los cortos serían el resultado de eventos endogámicos más distantes (en términos de generaciones ocurridas hasta desde el antecesor común), que fueron acortándose por los procesos de recombinación existentes en cada generación. En este sentido, se esperaría que el efecto de la depresión endogámica producido por los fragmentos largos fuese mayor que el producido por los cortos (Silió y col., 2013; Doekes y col., 2019; Makanjuola y col., 2020), debido a que al ser de mayor longitud, abarcarían más locus, aumentando así la

probabilidad de incluir loci desfavorables en homocigosis (Szpiech y col., 2013). Los fragmentos cortos, en cambio, serían menos perjudiciales debido a que la selección disminuye la frecuencia de alelos deletéreos en el tiempo mediante el proceso de purga genética (Hedrick y García-Dorado, 2016). Por tal motivo, los estudios actuales centrados en la detección de las causas de la depresión endogámica tienen en cuenta, cada vez más, el origen de los fragmentos de homocigosidad (ancestrales o recientes) como un agente causal (Ziegler y col., 2023).

Heterogeneidad espermática

Como fue mencionado en el capítulo anterior, el sistema CASA permite estimar varios parámetros de cada célula espermática, pudiendo de este modo capturar la heterogeneidad fenotípica existente en cada eyaculado, desde un punto de vista morfológico (Pitnick y col., 2009; Ramón y col., 2014), y cinemático (Muiño y col., 2008; Ibanescu y col., 2020). Al igual que en el análisis morfométrico, los métodos estadísticos de agrupamiento (descritos en el capítulo anterior) también son utilizados para analizar datos cinemáticos obtenidos a partir de CASA (Soler y col., 2017; Ramón y Martínez-Pastor, 2018), permitiendo determinar la existencia de subpoblaciones espermáticas compuestas por espermatozoides que presentan patrones de movimiento específicos. En el bovino suelen diferenciarse al menos cuatro subpoblaciones cinemáticas diferentes: rápidos progresivos, medios progresivos, lentos no progresivos e hiperactivos (Muiño y col., 2008; Ferraz y col., 2014; Ibanescu y col., 2020). Entre ellas, los rápidos progresivos e hiperactivos han sido previamente asociadas con la fertilidad, encontrándose un aumento en la fertilidad de aquellos individuos que presentaban un elevado porcentaje de rápidos progresivos e hiperactivos (Yániz y col., 2015; Hidalgo y col., 2021; Peres Campanholi y col., 2021). Variaciones en dichas subpoblaciones han sido previamente asociadas con la resistencia al proceso de crío-preservación (Martínez-Pastor y col., 2005), la variación del fenotipo espermático promedio entre individuos (Muiño y col., 2008; Ramón y Martínez-Pastor, 2018), y la fertilidad *in-*

vivo (Yániz y col., 2015; Hidalgo y col., 2021) e *in-vitro* (Ferraz y col., 2014) en diversas especies. Sin embargo, hasta la actualidad, solo un estudio ha evaluado la relación entre subpoblaciones cinemáticas existentes en un eyaculado y el nivel de endogamia en bovinos (Dorado y col., 2015). Si bien los autores han demostrado un efecto perjudicial de los niveles de endogamia en la proporción de espermatozoides rápidos no progresivos en estadios tempranos, asociadas con la fertilidad, el tamaño muestral analizado fue de tamaño reducido, y por ende dichos resultados deben ser evaluados con cautela.

El objetivo de este capítulo fue estudiar el efecto de la consanguinidad molecular, tanto a nivel cromosómico como por categoría de longitud, en el patrón de subpoblaciones espermáticas a través del tiempo, utilizando un modelo mixto de medidas repetidas.

Materiales y métodos

Muestras

En este estudio se analizaron 97 muestras de semen crio-preservado pertenecientes a tres razas de ganado bovino: dos razas carniceras (Retinta y Aberdeen Angus) y una lechera (Holstein).

Las muestras analizadas de la raza Retinta (n=56) pertenecen al programa de inseminación artificial de la Asociación Española de Criadores de Retinta, fueron recogidas y congeladas durante 10 años siguiendo los procedimientos estandarizados de la raza en el Centro Andaluz de Reproducción Animal (CENSYRA- Centro Regional de Selección y Reproducción Animal de Castilla- La Mancha). Las condiciones de colecta y crio-preservación fueron descritas detalladamente en el capítulo dos de esta tesis.

Las muestras de las razas Aberdeen Angus (n=27) y Holstein (n=14) fueron obtenidas del centro comercial de producción y comercialización de semen bovino CIALE Alta (Argentina). El semen fue congelado siguiendo un protocolo estandarizado para todas las muestras, luego de ser colectado mediante vagina artificial y diluido utilizando el diluyente comercial Andromed®. Solo fueron procesadas las muestras cuya motilidad y vigor masal, fueron mayores a 50% y 4, respectivamente. El espermatozoides fue equilibrado durante 2 horas a 5°C, tras lo cual se realizó una segunda dilución para alcanzar la concentración final de 24 millones/ml, se equilibró nuevamente 2 horas a 5°C y después se fraccionaron en pajuelas de 0,25 ml. Finalmente, las pajuelas se congelaron en una máquina automática siguiendo una curva de congelación, como sigue: Paso 1: de 5 a -5°C a -5°C/min; Paso 2: de -5°C por 120 s; Paso 3: de -5 a -100°C a -40°C; Paso 4: de -100 a -130°C a -30°C/min; Paso 5: de -130 a -140 a -30°C/min; Paso 6: -140 por 180 s. Tras la congelación, las pajuelas se sumergieron en N₂ y se almacenaron en el centro comercial CIALE Alta.

Obtención de ADN y genotipado de animales

El ADN de los animales de la raza Retinta se obtuvo a partir de muestras espermáticas descongeladas, como fue descrito en el capítulo dos. En el caso de las muestras de las razas Aberdeen Angus y Holstein, la extracción de ADN se realizó siguiendo un protocolo de extracción orgánica de sangre modificado (ver Información suplementaria 1). En todos los casos, la cantidad y calidad de ADN obtenido fueron evaluadas mediante electroforesis en geles de agarosa, espectrofotometría (Nanodrop (ThermoFisher, Piscataway, NY, USA)), descartándose aquellas que no cumplieren con los mínimos requisitos establecidos por el fabricante.

Los individuos de la raza Retinta fueron genotipados utilizando el SNP-*array* de mediana densidad Axiom™ Bovine Genotyping v2 (67.000 marcadores; Thermo Fisher Scientific), mientras que los individuos pertenecientes a las razas Aberdeen Angus y Holstein se genotiparon con el SNP-*array* de mediana densidad Axiom™ Bovine Genotyping v3 (63.000 marcadores; Thermo

Fisher Scientific). Los genotipos se analizaron y asignaron separadamente para cada versión de *array* (v2 y v3) utilizando el *software* Axiom™ Analysis Suite V 5.1.1.1 (Thermo Fisher Scientific). Se estableció un umbral de *call rate* individual y por SNP en 0,97 Y 0,90 respectivamente, y el filtro DQC (*Data Quality Control*) utilizado fue de 0,82. No se aplicó el filtro de frecuencia del alelo menor (MAF), ya que podría sesgar las estimaciones de endogamia genómica individual (Meyermans et al., 2020). Finalmente, se generó una base de datos de consenso incluyendo únicamente los marcadores localizados en los autosomas presentes en ambos SNP-*arrays* (n=44.937) utilizando el *software* PLINK v1.9 (Chang y col., 2015).

Análisis de coeficientes de endogamia basados en HBD (F_{HBD})

Los coeficientes de endogamia fueron determinados utilizando el procedimiento desarrollado por Druet y Gautier (2017) basado en modelos probabilísticos de Markov (HMM). Para ello, se utilizaron las funciones “*zoomodel*” y “*zoorun*” de la librería *RZooRoH*, que determinan el modelo y calculan las probabilidades de encontrar segmentos HBD de diferentes clases de longitud predefinidas, relacionadas con la generación en la que se produjeron. En el modelo se definieron 10 niveles (K=10; con valores de 6, 12, 18, 36, 72, 144, 288, 576, 1152, y 1152), siendo los primeros dos niveles correspondientes a fragmentos generados en las últimas tres y seis generaciones, respectivamente y el último valor correspondiente a segmentos que no son HBD, que pueden ser fragmentos idénticos por estado o heterocigotos. Los intervalos generados en base a estas clases se utilizaron como elementos de entrada (RUNS) para calcular los coeficientes de consanguinidad, utilizando la librería *detectRUNS* (Marras y col., 2015), con la función “*summaryRuns*”. Se calcularon los F_{HBD} totales, por cromosoma y por categorías de longitud correspondientes a las últimas tres 3G (HBD > a 16 Mb) y seis generaciones 6G (HBD > a 8 Mb), además de los fragmentos de generaciones ancestrales (fragmentos < a 5 Mb).

Evaluación de motilidad espermática

En total, se evaluaron 194 dosis seminales crio-preservedas pertenecientes a 56 toros Retintos, 27 toros Angus y 14 toros Holstein (dos pajuelas de diferente eyaculado por toro). Cada pajuela se descongeló durante 30 segundos a 37°C. Seguidamente se ajustó su concentración a 25 millones de spz/ml utilizando diluyente Biladyl® (Minitübe, Tiefenbach, Alemania), dejándose equilibrar durante 5 minutos en una placa Nunclon (Nunc, Roskilde, Dinamarca) de cuatro pocillos a 37°C. Finalmente, se determinó la motilidad y la cinemática espermática. Para Retinta se utilizó un sistema CASA (Sperm Class Analyzer 5.4.0.0 Microptic SL, Barcelona, España) en un microscopio Olympus BH-2 144 (Olympus, Tokio, Japón); mientras que, para Holstein y Angus, se utilizó el sistema CASA (Androvision®, Minitube, Alemania) montado en un microscopio ZEISS Axio Lab.A1 (Zeiss, Alemania). En ambos casos las imágenes fueron capturadas por una cámara digital de 25 imágenes por segundo sobre una cámara de conteo descartable ad-hoc apoyada en una platina atemperada a 37°C. Cada evaluación fue realizada por duplicado analizando dos gotas de 5 μ l de esperma sobre las cuales se evaluaron tres campos visuales diferentes.

En cada dosis se analizaron al menos 500 espermatozoides individuales sobre los cuales se determinaron tres parámetros cinemáticos asociados a la velocidad: velocidad curvilínea (VCL; μ m/s), velocidad en línea recta (VSL; μ m/s) y velocidad media de la trayectoria (VAP; μ m/s); y dos parámetros cinemáticos relacionados con el movimiento de la cabeza: amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza (ALH; μ m) y frecuencia de cruce de la cabeza con respecto a su trayectoria promedio (BCF; Hz). Adicionalmente, se obtuvieron los índices derivados de los ratios de las velocidades: linealidad (LIN, ratio de VSL/VCL, expresado en %), rectitud (STR, ratio de VSL/VAP, expresado en %), oscilación (WOB, ratio de VAP/VCL, expresado en %). Paralelamente, se determinó en cada dosis la motilidad total (MT) y progresiva (MP) del conjunto de los espermatozoides analizados.

Variación espermática en el tiempo

Para el ensayo de longevidad espermática se determinaron los 8 parámetros cinemáticos a lo largo de un período de 120 minutos mediante tres determinaciones independientes (T0, T1 y T2), realizadas a los 5, 60 y 120 minutos tras el descongelado. Para el análisis, sólo se consideraron datos de las muestras que presentaban una MT > 60% en T0 y un MP > 30% en el resto de los puntos temporales.

Determinación de subpoblaciones espermáticas

El análisis de subpoblaciones espermáticas se realizó siguiendo el procedimiento de dos pasos descrito por Martínez-Pastor y col. (2005). En primer lugar, se realizó la curación de datos, donde solo se consideraron motiles aquellos espermatozoides con VAP > 10, descartándose también aquellos que presentaban valores de 0 en alguno de los demás parámetros (artefactos de análisis). Seguidamente, se realizó un análisis de componentes principales (PCA) para disminuir la cantidad de variables analizadas y elegir aquellas que expliquen mejor la variabilidad de los datos, y que a su vez presenten baja correlación entre sí. Una vez seleccionadas las variables, se estandarizaron sus valores, restándole el promedio de la variable y dividiendo por el desvío estándar. Posteriormente, se realizó un agrupamiento no jerárquico mediante un modelo *K-means*, que utiliza la distancia multivariada euclidiana para calcular los centros de los *clusters*, y reduciendo su variabilidad a un número menor, para finalmente agruparse utilizando el método Ward (menor varianza estadística al unirse) y asignarlos a un *cluster* específico. El número final de *clusters* fue establecido en base a la bibliografía consultada de subpoblaciones motiles en bovinos (Muiño y col., 2008; Ferraz y col., 2014; Hidalgo y col., 2021). Finalmente, se calculó el porcentaje relativo de cada subpoblación por individuo y por tiempo, así como los valores promedios para cada uno de los parámetros analizados en cada grupo.

Análisis funcional HBDi

Una vez obtenidas las regiones HBD, se realizó un análisis para identificar islas HBD y buscar regiones génicas que puedan explicar el carácter estudiado. Se realizaron tres análisis diferentes, por un lado, evaluando las regiones enriquecidas por raza, para descartar aquellas regiones asociadas al proceso selectivo de la raza y que no estén asociadas al carácter estudiado. Por otro lado, se realizó un análisis considerando la totalidad de las muestras y la totalidad de los fragmentos, sin discriminar por raza, pero eligiendo aquellos marcadores presentes en cromosomas que resultaron significativos en la evaluación de depresión endogámica. Luego se llevó a cabo un análisis teniendo en cuenta solo los marcadores presentes en fragmentos cuya longitud se haya correlacionado con el alguno de los caracteres estudiados. El análisis se llevó a cabo utilizando un script diseñado por el grupo de trabajo e implementado en la plataforma R.

En primer lugar, se realizó un test de permutaciones para identificar SNPs estadísticamente significativos presentes en HBD bajo la hipótesis nula de que los HBD están distribuidos de igual manera en el genoma, comparando cien mil de veces el número real de HBD en cada SNP con un valor aleatorio de la población. Para calcular el valor de significancia de cada SNP en HBD, se estimó el número de veces que el valor aleatorio era mayor al número observado. Luego, se eligieron las regiones genómicas contenidas en los SNP significativos con distancia entre SNPs consecutivos $\leq 1\text{Mb}$ y un $p < 0,01$. Posteriormente, se utilizaron dichas regiones para obtener objetos GRanges utilizando la librería *GenomicRanges* (Lawrence y col., 2013). Los intervalos se utilizaron para obtener listas de genes de *ENSEMBL BioMart v89* (Martin y col., 2022). Luego se utilizó la lista de genes para realizar un análisis de ontología génica en DAVID (Huang da y col., 2009; Sherman y col., 2022). Paralelamente, también se realizó una búsqueda de QTL's en la plataforma *QTLs database* (Hu y col., 2021) partiendo de los intervalos hallados en cada raza.

Estudio de la depresión endogámica

En primera instancia, los animales fueron divididos por su nivel de endogamia en dos grupos, utilizando las siguientes categorías: endogamia baja: $F_{HBD} \leq 0,125$ (n=46) y, endogamia alta: $F_{HBD} > 0,125$ (n=51). Para determinar el efecto de la endogamia en las subpoblaciones espermáticas, se utilizó un modelo marginal de efectos mixto para medidas repetidas implementado en la librería *lme4* (Bates y col., 2015) en R. El porcentaje de cada subpoblación espermática fue establecido como variable dependiente, mientras que el tiempo (tres niveles: T0, T1 y T2) y el grupo F_{HBD} (dos niveles: alta o baja endogamia) se establecieron como variables independientes. A su vez, se modeló una estructura de matriz de covarianza de tipo autoregresiva de primer orden para modelar el error del individuo dentro de cada raza. Los grupos de F_{HBD} totales, por categoría de longitud y por cromosoma se evaluaron por separado y se usaron dos niveles en todos los casos. El modelo planteado fue el siguiente:

$$y_{ijk} = \mu + \beta_i + t_j + \beta_i \times t_j + \varepsilon_{ijk}$$

donde, y_{ijk} es el promedio de la proporción de cada subpoblación por individuo; μ es el promedio de cada subpoblación en la población, β_i es el efecto del grupo F_{HBD} ; t_j es el efecto del tiempo j ; $\beta_i \times t_j$ es el efecto de la interacción grupo F_{HBD} -tiempo y ε_{ijk} es el error aleatorio.

Resultados

Coefficiente de endogamia genómico F_{HBD}

Los coeficientes de endogamia F_{HBD} calculados por raza y por largo de fragmento se resumen en la Tabla 1 y Figura 1. Los F_{HBD} por cromosoma y por raza se muestran en la Figura 2.

Los F_{HBD} totales no mostraron diferencias significativas entre razas, sugiriendo que, a nivel global, todas cuentan con el mismo nivel de consanguinidad. Sin embargo, el análisis de los F_{HBD}

por categoría de longitud demostró que la raza Angus tuvo valores de F_{HBD} ancestral significativamente mayores ($p < 0,05$) que las razas Retinta y Holstein (Tabla 1).

Tabla 1. Coeficientes F_{HBD} por categoría de longitud y por raza en Angus, Holstein y Retinta. Los coeficientes se expresan como promedios \pm error estándar

F_{HBD}	Angus	Holstein	Retinta
F_{HBD} total	0.1296 ± 0.006^a	0.1509 ± 0.0097^a	0.121 ± 0.0102^a
F_{HBD} 3G	0.0155 ± 0.0034^b	0.0393 ± 0.0079^a	0.055 ± 0.007^a
F_{HBD} 6G	0.0404 ± 0.0046^b	0.0787 ± 0.0078^a	0.0853 ± 0.0091^a
F_{HBD} ancestral	0.0992 ± 0.0024^a	0.0722 ± 0.0027^b	0.0357 ± 0.0016^c

^{abc} Superíndices diferentes indican diferencias significativas entre cada raza (Kruskal Wallis, $p < 0,05$)

Además, tanto Holstein como Retinta mostraron valores de F_{HBD} de tres y seis generaciones mayores que Angus, aunque no se observaron diferencias entre ellos. Por otro lado, los valores de F_{HBD} por cromosoma mostraron diferencias significativas en BTA2, BTA4, BTA10, BTA11, BTA13, BTA16, BTA19, BTA23, BTA25 y BTA29 entre las diferentes razas (Figura 2).

Determinación de subpoblaciones

El análisis de componentes principales (PCA) reveló que los primeros dos componentes explicaban aproximadamente el 80% de la variabilidad de los datos. Entre las variables seleccionadas para el análisis no jerárquico, se incluyeron aquellas que presentaban los valores más altos en PC1: parámetro VSL (puntuación 0,48) y VAP (puntuación 0,43) y en PC2, el parámetro ALH (puntuación 0,52) y el parámetro LIN (puntuación 0,45).

Finalmente, se determinaron cuatro subpoblaciones espermáticas con características cinemáticas específicas (Figura 3).

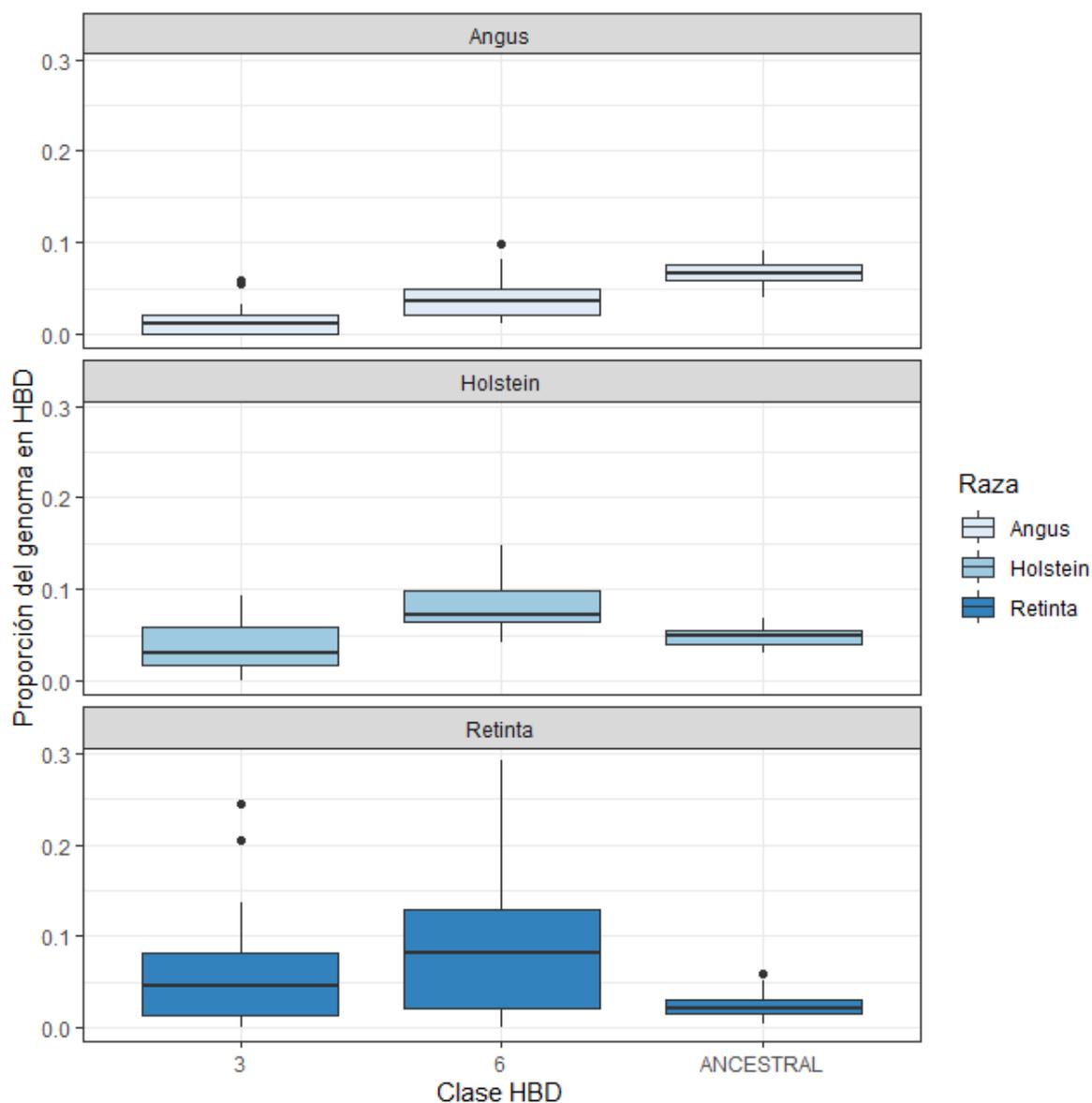


Figura 1. Gráfico de cajas de la distribución de la proporción de HBD (F_{HBD}) por número de generaciones (tres y seis, y ancestral) en la cual se formaron. La imagen superior muestra la distribución de F_{HBD} de la raza Angus, la imagen del medio corresponde a la distribución de F_{HBD} de la raza Holstein, y, finalmente la imagen inferior muestra la distribución de F_{HBD} en Retinta.

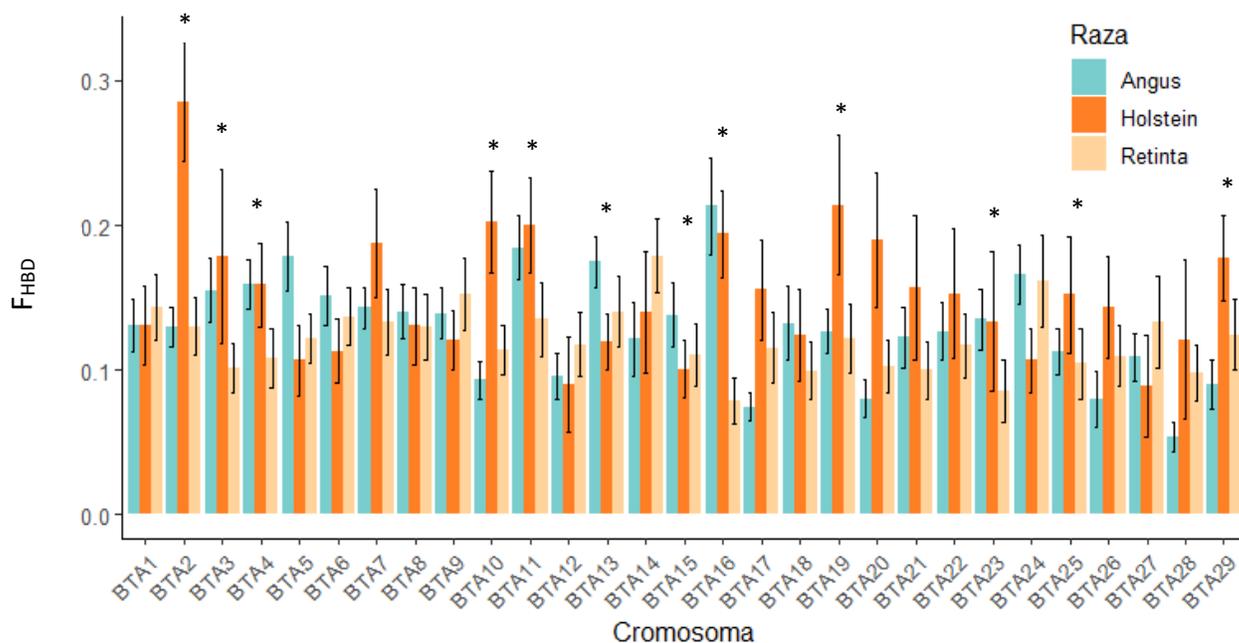


Figura 2. F_{HBD} por cromosoma y por raza en Angus, Holstein y Retinta. Los resultados son expresados como el número promedio de F_{HBD} por cromosoma por raza ± error estándar de la media (Kruskal Wallis *p<0,05).

La subpoblación 1 (SP1) estuvo formada por los espermatozoides rápidos progresivos, los cuales se caracterizan por presentar valores altos de velocidades, LIN y BCF, mientras que presenta valores bajos de ALH. La subpoblación 2 se caracterizó por estar representada por aquellos espermatozoides de motilidad media progresiva, presentan valores medios de velocidades, alto LIN y BCF y bajo ALH. Por otra parte, la subpoblación 3 estuvo representada por los espermatozoides lentos no progresivos, cuyas velocidades son bajas, al igual que LIN y BCF, mientras el valor de ALH suele ser de medio a alto. Por último, la subpoblación 4 representó a los espermatozoides hiperactivos, caracterizados por presentar un movimiento rápido no progresivo, con valores de VCL, BCF y ALH altos, bajo LIN, STR y WOB.

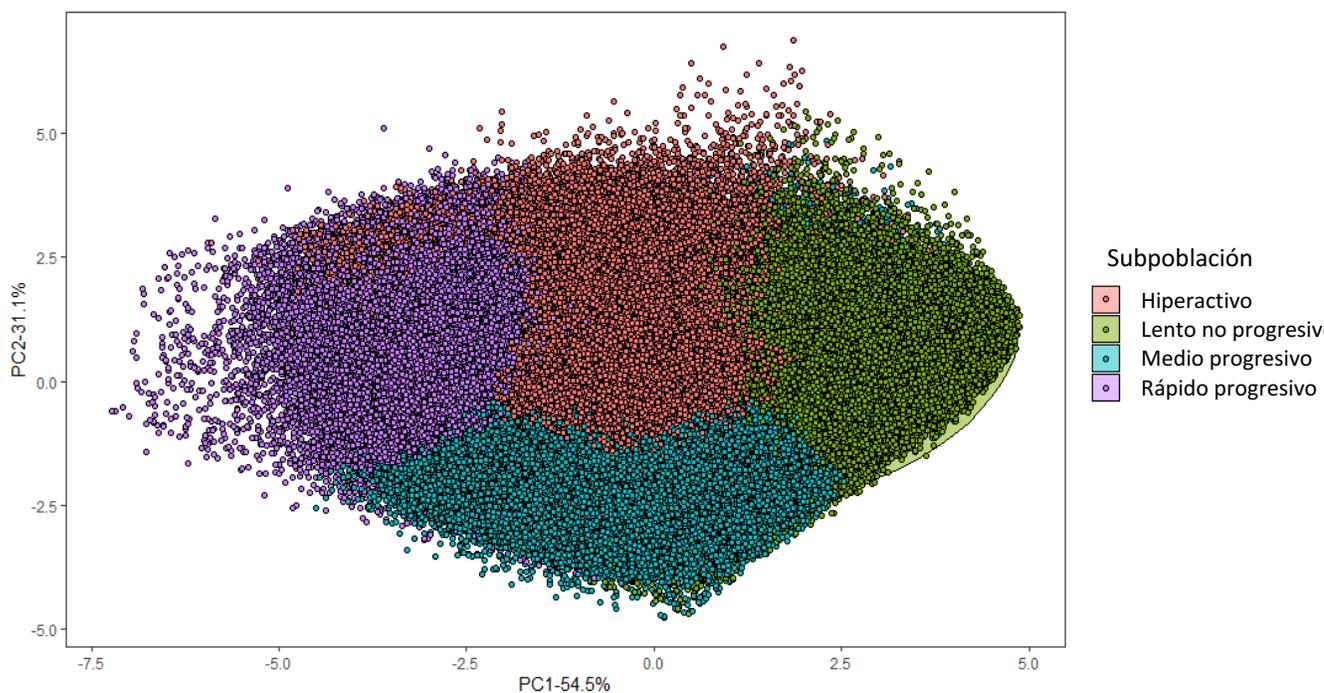


Figura 3. Gráfico de agrupamiento de subpoblaciones espermáticas explicadas por los componentes 1 (explica el 54,5% de la varianza) y 2 (explica el 31,1% de la varianza).

Depresión endogámica

El análisis de depresión endogámica no demostró una asociación significativa entre el porcentaje de cada subpoblación de esperma y el coeficiente de endogamia total. Sin embargo, al analizar por categoría de longitud y cromosoma se observó un efecto del aumento de la consanguinidad ($p < 0,05$) en dos subpoblaciones específicas: los espermatozoides medios progresivos (Sp2) y los hiperactivos (Sp4) (Tabla 2).

A nivel cromosómico, BTA11, BTA13 y BTA16 mostraron un efecto significativo ($p < 0,05$) en las subpoblaciones espermáticas. Un alto nivel de endogamia en BTA16 se asoció con un aumento de la proporción de medios progresivos en todos los tiempos estudiados. El grupo de individuos con alta endogamia ($F_{HBD} > 0,125$) en BTA11, presentó una proporción de medios progresivos significativamente mayor en los tiempos T1 y T2, mientras que un alto nivel de

endogamia en BTA13 estuvo asociado a un aumento de medios progresivos en T0. Además, el aumento de la endogamia en BTA11 y BTA16 mostró un efecto significativo en la subpoblación de hiperactivos, la cual fue mayor en todos los tiempos estudiados en los animales con bajos niveles de endogamia en ambos cromosomas.

En cuanto a los análisis realizados por categoría de longitud de ROH, los resultados fueron opuestos a los hallados a nivel cromosómico. La única categoría que presentó diferencias significativas fue la correspondiente a las últimas seis generaciones (HBD > 8 Mb), en la cual, los medios progresivos estuvieron significativamente más representados en el grupo de individuos que presentaba $F_{HBD} \leq 6G < 0,125$, mientras que los hiperactivos estuvieron mayormente representados en el grupo de alta endogamia.

Regiones genómicas significativamente afectadas por la endogamia

El análisis global de regiones enriquecidas en fragmentos HBD resultó en el hallazgo de 37 intervalos con un valor p promedio <0,05, localizados en BTA4, BTA5, BTA7, BTA9, BTA11, BTA14, BTA19 y BTA24. Por su parte, en el análisis realizado por razas, se detectaron seis intervalos en la raza Angus, ubicados en BTA16 y, un intervalo en Retinta, localizado en BTA14 que se superpuso con 5 intervalos identificados en la población total. No se detectaron SNP's significativos en la raza Holstein. En lo que respecta al análisis por categoría de longitud, se realizó el análisis de los SNPs que se encontraron en HBD formados en las últimas 6 generaciones (>8Mb). La información de los intervalos se resume en la Tabla Suplementaria 1 de este capítulo.

Entre los cromosomas con regiones enriquecidas en HBD detectadas en el análisis global, solo BT11 coincidió con lo encontrado en el análisis de depresión endogámica. Sin embargo, no fueron localizados genes en esas posiciones que hayan sido previamente asociados a algún proceso o estructura espermática.

Tabla 2. Efecto de la depresión endogámica en las subpoblaciones espermáticas por cromosoma y categoría de longitud de F_{HBD} . Los cromosomas y longitudes restantes no mostraron efectos significativos sobre los porcentajes de subpoblaciones espermáticas.

Cromosoma /Categoría	Subpoblación	Efecto	Tiempo								
			T0			T1			T2		
			AE	BE	p	AE	BE	p	AE	BE	p
BTA11	Medios progresivos	Mayor en grupo de alta endogamia	39,9	31,6	0,1046	41,4	28,3	0,0273	50,4	34,0	0,0063
BTA11	Hiperactivos	Mayor en grupo de baja endogamia	19,6	26,9	0,0259	27,4	43,2	0,0010	22,1	38,4	0,0010
BTA13	Medios progresivos	Mayor en grupo de alta endogamia	40,8	30,9	0,0243	40,6	29,4	0,0922	46,5	38,3	0,5278
BTA16	Medios progresivos	Mayor en grupo de alta endogamia	42,3	31,7	0,0142	45,7	28,2	0,0006	54,3	34,4	0,0003
BTA16	Hiperactivos	Mayor en grupo de baja endogamia	19,0	25,9	0,0522	25,1	41,5	0,0007	20,2	36,7	0,0012
F_{HBD} 6G	Medios progresivos	Mayor en grupo de baja endogamia	24,6	38,0	0,0279	21,3	37,6	0,0636	21,9	46,1	0,0029
F_{HBD} 6G	Hiperactivos	Mayor en grupo de alta endogamia	32,5	21,4	0,0085	53,1	31,7	0,0012	43,8	27,4	0,0581

*AE: grupo de alta endogamia ($F_{HBD} \geq 0,125$); BE: grupo de baja endogamia ($F_{HBD} < 0,125$)

Por su parte, las regiones provenientes de fragmentos de todas las longitudes, permitió la detección de 155 genes significativamente enriquecidos en HBD ($p < 0,05$), mientras en el análisis de HBD > 8Mb se encontraron 127 genes. El análisis de anotación funcional del primer grupo de genes reveló la existencia de un *cluster* significativamente enriquecido (puntuación 1,44) que estuvo asociado a procesos catalíticos y actividad endo-peptidasa (Tabla 3). Mientras que, en el segundo, se encontraron dos grupos enriquecidos; el primero de ellos estuvo asociado a actividad de la ARN polimerasa y regulación de la neurogénesis, y el segundo, relacionado con la estructura de aminoácidos polares (Tabla 4).

El análisis por raza, reveló la presencia ocho genes presentes en HBDi en Angus, aunque ninguno tuvo un p significativo ($p > 0,05$). Sin embargo, cuando se realizó la búsqueda de QTL's en esos intervalos, se encontraron varios, algunos de los cuales fueron previamente relacionados con caracteres como: peso de la canal, fuerza de corte e índice de marmolado. Finalmente, en la raza Retinta, se encontraron seis genes significativamente afectados por la endogamia ($p < 0,05$), los cuales fueron asociados con QTL's de crecimiento y de peso de la canal.

Tabla 3. Anotación funcional de genes en regiones enriquecidas en HBD en poblaciones de Angus, Holstein y Retinta.

Cluster 1		Enrichment Score: 1.44		
Categoría	Término	p	Genes	Fold Enrichment
GOTERM_BP_DIRECT	proteolysis	0,0033	<i>CNDP1,CNDP2,CFD,ELANE,PTRN3</i>	8
INTERPRO	Peptidase S1A, chymotrypsin-type	0,0096	<i>AZU1,CFD,ELANE,PRTN3</i>	9
INTERPRO	Peptidase S1	0,013	<i>AZU1,CFD,ELANE,PRTN3</i>	8,2
UP_SEQ_FEATURE	DOMAIN:Peptidase S1	0,013	<i>AZU1,CFD,ELANE,PRTN3</i>	8
INTERPRO	Trypsin-like cysteine/serine peptidase domain	0,014	<i>AZU1,CFD,ELANE,PRTN3</i>	7,8
SMART	Tryp_SPc	0,016	<i>AZU1,CFD,ELANE,PRTN3</i>	7,3
UP_KW_MOLECULAR_FUNCTION	Protease	0,019	<i>CNDP1,CNDP2,CFD,ELANE,PTRN3,USP18</i>	3,7
GOTERM_MF_DIRECT	serine-type endopeptidase activity	0,032	<i>AZU1,CFD,ELANE,PRTN3</i>	5,7
INTERPRO	Peptidase S1, trypsin family, active site	0,061	<i>CFD,ELANE,PRTN3</i>	7,4
UP_KW_MOLECULAR_FUNCTION	Serine protease	0,07	<i>CFD,ELANE,PRTN3</i>	6,7
UP_KW_MOLECULAR_FUNCTION	Hydrolase	0,12	<i>ABHD17A,CNDP1,CNDP2,CFD,DNM1L,ELANE,PNPLA8,PRTN3,USP18</i>	1,7
GOTERM_CC_DIRECT	extracellular space	0,57	<i>LYPD8,AZU1,CFD,CBLN2,ELANE,PRTN3</i>	1,2
UP_KW_PTM	Disulfide bond	0,97	<i>ASPH,CA4,CFD,ELANE,EFNA2,PRTN3</i>	0,68

Tabla 4. Anotación funcional de genes en regiones enriquecidas en HBD>8Mb en poblaciones de Angus, Holstein y Retinta.

Cluster 1		Enrichment Score: 2.71		
Categoría	Término	p	Genes	Fold Enrichment
UP_SEQ_FEATURE	DOMAIN:BHLH	0,000016	<i>BHLHE22,HES2,HES3,HEY1,MSC,NCOA2</i>	19
INTERPRO	Myc-type, basic helix-loop-helix (bHLH) domain	0,000031	<i>BHLHE22,HES2,HES3,HEY1,MSC,NCOA2</i>	16
SMART	HLH	0,000058	<i>BHLHE22,HES2,HES3,HEY1,MSC,NCOA2</i>	14
GOTERM_MF_DIRECT	protein dimerization activity	0,0001	<i>BHLHE22,HES2,HES3,HEY1,MSC,NCOA2</i>	13
GOTERM_MF_DIRECT	RNA polymerase II core promoter proximal region sequence-specific DNA binding	0,0018	<i>MYBL1,TBX18,BHLHE22,HNF4G,HES2,HES3,HEY1,MSC,NCOA2,ZB TB48,ZFHX4</i>	3,2
GOTERM_BP_DIRECT	regulation of neurogenesis	0,0082	<i>HES2,HES3,HEY1</i>	22
GOTERM_BP_DIRECT	regulation of transcription from RNA polymerase II promoter	0,025	<i>PRDM14,TBX18,BHLHE22,CAMTA1,CHD5,HNF4G,HES2,HES3,HEY 1,MSC,ZBTB48,ZFHX4</i>	2,1
GOTERM_MF_DIRECT	RNA polymerase II transcription factor activity, sequence-specific DNA binding	0,037	<i>MYBL1,TBX18,BHLHE22,HNF4G,HES2,HES3,HEY1,MSC,ZFHX4</i>	2,5
GOTERM_BP_DIRECT	anterior/posterior pattern specification	0,053	<i>HES2,HES3,HEY1</i>	8

KEGG_PATHWAY Human papillomavirus infection 0,34 HES2,HES3,HEY1 2,4

Cluster 2 Enrichment Score: 2.01

Categoría	Término	p	Genes	Fold Enrichment
UP_SEQ_FEATURE	COMPBIAS:Polar residues	0,0022	ARFGEF1, ERRF1, EYA1, GPR153,PHF13, YTHDF3, ASPH, PKIA, CAMTA1, CEP162, CSPP1, C14H8orf89, CYB5R4, ESPN, HES3, HEY1, MTFR1, MRPS28, NPHP4, NCOA2, PLEKHG5, KCNB2,SLCO5A1, STAU2, SULF1, TRAM1, TPD52, VCPIP1, ZC2HC1A, ZBTB48, ZFHX4	1,7
UP_SEQ_FEATURE	REGION:Disordered	0,0033	ARFGEF1, ERRF1, EYA1, GPR153, MYBL1,PHF13, PRDM14, TBX18, THAP3, TNFRSF25, YTHDF3, ACOT7, ASPH, BHLHE22, PKIA, CAMTA1, CEP162, CSPP1, CHD5, C14H8orf34, C14H8orf89, CLVS1,CYB5R4, ESPN, HNF4G, HES2, HES3, HEY1, IL7, KLHL21, MTFR1, MRPS28, MSC, NPHP4, NCOA2, NOL9, PREX2, PLEKHG5, KCNB2, RNF207, RIPPLY2, SLCO5A1, STAU2, SULF1, TERF1, TRAM1, TPD52, VCPIP1, VAMP3, ZC2HC1A, ZBTB48, ZFHX4	1,3

UP_SEQ_FEATURE	COMPBIAS: Basic and acidic residues	0,13	<i>ARFGEF1,EYA1,TBX18,ACOT7,ASPH,CEP162,CSPP1,CHD5,C14H8orf34,ESPN,MTFR1,NCOA2,PREX2,KCNB2,RNF207,SLCO5A1,SULF1,TERF1,TPD52,ZBTB48,ZFHX4</i>	1,3
----------------	-------------------------------------	------	--	-----

Discusión

En este capítulo se evaluó el efecto de la consanguinidad en el patrón de subpoblaciones espermáticas utilizando dos enfoques: a nivel cromosómico, y a nivel de longitud. Este estudio permitió identificar un efecto diferencial a nivel de cromosoma y un efecto perjudicial de la endogamia reciente, como ya ha sido planteado en estudios anteriores (Makanjuola y col., 2020), afectando las subpoblaciones de hiperactivos y medios progresivos. Además, se identificó un grupo de genes presuntamente afectados por la endogamia.

Diferencias de fragmentos HBD por raza

La caracterización de HBD por raza, permitió observar diferencias no solo en la abundancia de los fragmentos sino también en su longitud. Si bien la raza que presentó un mayor porcentaje de homocigosidad fue Holstein, en términos de longitud de fragmentos, la raza Retinta fue la que presentó mayor proporción de fragmentos largos, correspondientes a las últimas seis generaciones. Esto puede explicarse por su programa de selección, centrado en obtener mejoras productivas, reproductivas y de adaptación al medio, que no tuvo en cuenta la relación de parentesco entre los cruzamientos hasta épocas recientes, provocando un aumento de la consanguinidad reciente en la población (Morales y col., 2017). Por otro lado, la raza Holstein ha sufrido una fuerte presión de selección como consecuencia de aumentar la producción de leche, lo cual ha reducido marcadamente su variabilidad genética (Marras y col. (2015)). A su vez, también se evidenciaron diferencias a nivel cromosómico, siendo la raza Holstein la que presentó un mayor F_{HBD} en varios cromosomas en comparación con las otras dos razas. Curiosamente, en algunos cromosomas, la raza Angus mostró niveles de endogamia superiores a las otras dos razas, a pesar de su reducido valor promedio, los cuales podrían estar asociados a huellas de selección propias (Utsunomiya y col., 2013). Al realizarse el análisis de las regiones enriquecidas en

fragmentos en homocigosis por raza, se encontró en Angus un total de seis intervalos con marcadores significativamente enriquecidos en BTA16, el cual fue uno de los cromosomas que mostró una abundancia significativa de HBD en esta raza. En la raza Retinta también se encontraron dos intervalos en BTA14, los cuales, curiosamente, se solaparon con cinco intervalos encontrados en población total. Estos resultados remarcan la importancia del efecto racial en la determinación de la influencia de la endogamia en el bovino, lo cual justifica, fuertemente su inclusión en este tipo de análisis.

Depresión endogámica en calidad espermática

El efecto de la consanguinidad sobre la calidad espermática ha sido estudiado previamente, teniendo en cuenta caracteres como el número total de espermatozoides y el porcentaje de espermatozoides vivos (Ferenčaković y col., 2017) o la viabilidad y la motilidad espermática (Maximini y col., 2011; Antonios y col., 2021). Sin embargo, solo Dorado y col. (2015) han analizado la relación entre endogamia y subpoblaciones cinemáticas en bovinos, demostrando que los animales con elevado nivel de consanguinidad (>13,5%) presentaban una mayor proporción de espermatozoides hiperactivos al descongelado, junto a menores valores de fertilidad a campo. No obstante, es importante resaltar que dicho estudio fue realizado utilizando estimaciones de consanguinidad basadas en datos de pedigrí (lo cual impide cualquier tipo de análisis por cromosoma u origen de la endogamia), analizando un grupo de animales muy reducido.

En este capítulo, se usaron tres enfoques para analizar la depresión endogámica, obteniéndose diferentes resultados. Por un lado, se estudió la depresión endogámica considerando el valor total de consanguinidad, sin encontrar ningún efecto significativo sobre las subpoblaciones espermáticas. Por el contrario, en el análisis de la depresión por endogamia a nivel

cromosómico, se encontraron valores significativos en tres cromosomas diferentes: BTA11, BTA13, y BTA16, asociados con un aumento en la proporción de medios progresivos. Adicionalmente, se observó una disminución de la proporción de hiperactivos asociados al grupo de alta consanguinidad en BTA11 y BTA16. Estos resultados concuerdan con lo hallado por Pilon y col. (2021), quienes no detectaron depresión endogámica usando F_{PED} o F_{ROH} global en el carácter ganancia diaria promedio en animales de la raza Hereford, pero sí lo hicieron a nivel cromosómico, señalando la importancia del análisis por región genómica en homocigosis, más que el cálculo global del coeficiente.

En el análisis por categoría de longitud, se encontró que la endogamia reciente (últimas seis generaciones) provocaba un aumento en la proporción de espermatozoides hiperactivos en individuos con alto nivel de endogamia a T0, manteniéndose hasta T1, mientras que, no hubo diferencias entre grupos en T2. Similarmente, Dorado y col. (2015) plantearon que la manifestación de este patrón de hiperactividad en estadios tempranos era perjudicial para la fertilidad de estos animales debido a que este tipo de movimiento requiere de un mayor metabolismo, provocando que agoten sus reservas energéticas más rápidamente y reduciendo así su capacidad de fertilización. Cabe destacar, que el inicio y mantenimiento de la motilidad hiperactiva depende, entre otros factores, de una vía de señalización mediada por Ca^{2+} en el flagelo (Marquez y Suarez, 2004). Este patrón se produce en un sitio determinado del tracto reproductivo y en un momento específico, que varía según la morfología reproductiva de la especie, debido a los altos requerimientos energéticos que demanda (Sansegundo y col., 2022). En tal sentido, (Marquez y Suarez, 2004) demostraron que, en condiciones *in-vitro*, la hiperactivación mediada por agentes estimulantes se produce de manera inmediata en bovinos, disminuyendo a la hora 4. Estos estudios justifican la hipótesis de que la manifestación temprana

de este tipo de movimiento, puede provocar un descenso de tal patrón de motilidad debido a falta de reservas energéticas cuando éste sea requerido.

Al comparar los resultados del análisis por cromosoma y por longitud se encontraron resultados discordantes, ya que mientras en el análisis por cromosoma un aumento de homocigosis en BTA11 y BTA 16 se asocia con una disminución en la proporción de hiperactivos, en el análisis por longitud, el mismo aumento, pero en la categoría correspondiente a endogamia reciente, se asoció con un aumento en el patrón hiperactivo. Una discordancia similar pero únicamente a nivel cromosómico, fue encontrada en Laseca y col. (2022) analizando la fertilidad en equinos. Los autores observaron que los distintos cromosomas presentaban diferentes grados de correlación entre su valor de endogamia (estimada como F_{HBD}) y la estimación genética de la fertilidad potencial del individuo. Los autores plantearon que podría deberse al carácter altamente poligénico de la fertilidad, donde ciertos cromosomas podrían albergar QTL's con mayor influencia en el carácter que otros, y, por ende, explicar mejor la variabilidad fenotípica observada. De la misma manera, Kim y col. (2015) propusieron que la depresión por endogamia en caracteres de fertilidad podría explicarse por el efecto genético aditivo de haplotipos homocigotos en distintos loci. Por su parte, Howard y col. (2017) plantearon que el análisis de haplotipos debería realizarse considerando solo aquellos que se encuentran en fragmentos largos, ya que los cortos son el remanente de la purga genética, y no serían desfavorables con lo cual no deberían ser tenidos en cuenta ya que podrían enmascarar el efecto deletéreo del aumento de la homocigosis. Estos resultados, sumados a las inconsistencias encontradas en la bibliografía respecto al análisis de depresión por endogamia a nivel cromosómico, nos hacen plantear que las estimaciones derivadas de los F_{HBD} calculados por categoría de longitud podrían ser más fiables ya que permiten distinguir la endogamia reciente, que ha demostrado ser potencialmente más perjudicial que los fragmentos cortos producidos varias generaciones atrás (Doekes y col., 2019; Makanjuola y col., 2020). En

consonancia con estas hipótesis, en el presente capítulo los F_{HBD} ancestrales no tuvieron efecto en el patrón de subpoblaciones, posiblemente debido al efecto de la purga de alelos deletéreos (García-Dorado, 2012).

Finalmente, cabe resaltar que, tanto desde el enfoque de categoría de longitud como cromosómico, una de las subpoblaciones más afectadas por la consanguinidad fue la de hiperactivos. Este patrón de motilidad se manifiesta durante el proceso de capacitación. Sin embargo, se ha encontrado que la hiperactivación temprana puede ocurrir como consecuencia del proceso de congelación-descongelación (Peris-Frau y col., 2020). Esto puede deberse a la pérdida de estabilidad en la membrana plasmática, como consecuencia del daño criogénico, que altera la permeabilidad de la membrana provocando un aumento en la entrada de Ca^{2+} , lo que activaría la vía que inicia el proceso de hiperactivación. Olds-Clarke (1989) demostró que existe una componente genética en la hiperactivación temprana (al menos en modelos murinos), aunque no se determinó el mecanismo que la desencadenaría. En tal caso, dicha componente genética podría estar afectada por el aumento de la endogamia, explicando al menos parcialmente, los hallazgos de este capítulo en el bovino doméstico.

Regiones diferencialmente afectadas por la endogamia

La superposición de los intervalos encontrados a la anotación funcional del genoma bovino actual (ARS-UCD1.2) resultó en una lista de 155 genes diferencialmente afectados por la endogamia total y 127 afectados por la endogamia reciente. Aunque los grupos de anotación funcional resultantes no estuvieron relacionados a componentes o función espermática en ninguno de los análisis, al estudiarse los genes individualmente, dos de ellos significativamente afectados por la endogamia reciente ($p < 0,05$), fueron asociados a fertilidad y regulación del movimiento espermático. El gen *PRDM14* codifica para una metiltransferasa de histonas y ha sido

previamente reportada por su rol en el desarrollo de la línea germinal (Yamaji y col., 2008) , y además, se asoció positivamente con la fertilidad en toros (Verma y col., 2015; Özbek y col., 2021). Por su parte, el gen *NPHP4* estuvo relacionado con la motilidad espermática y disminución de la fertilidad en ratones (Won y col., 2010). Asimismo, en otro estudio se demostró que la falta de expresión del producto de este gen alteraba la linealidad del movimiento espermático (Awata y col., 2014). Este estudio es interesante, ya que, a lo largo de esta tesis, uno de los caracteres afectados por la endogamia fue la hiperactivación espermática, que como se mencionó anteriormente, se caracteriza por un movimiento errático con baja linealidad. Por lo tanto, este hallazgo refuerza nuestra hipótesis de que la depresión endogámica en el movimiento espermático afecta la hiperactivación, y puede ser explicada parcialmente por este gen.

En cuanto al análisis de las regiones exclusivas de cada raza, en Retinta, se encontraron cinco genes asociados a QTL's previamente reportados. Entre ellos, *CHD7* y *CA8* se asociaron al factor de crecimiento de insulina tipo 1 y a su vez, *CA8* también estuvo asociado con el rendimiento de producción láctea. Por su parte, *RAB2A*, *UBXN2B* y *TOX* han sido asociados con el peso de la canal. Dadas las características de la raza, las regiones afectadas podrían estar indicando un proceso de selección tendiente a aumentar el rendimiento de la producción de carne, principal objetivo de esta raza. Similarmente, al analizar el intervalo encontrado en la raza Angus, se encontraron QTL's relacionados con el peso corporal, peso de la canal y área de ojo de bife, caracteres fuertemente seleccionados en la raza. Aunque previamente se han realizado estudios de fragmentos de homocigosis asociados al proceso selectivo de la raza, este es el primer estudio de regiones asociadas al proceso selectivo de la raza Retinta.

Conclusión

Se detectó la existencia de depresión endogámica a nivel cromosómico y por categoría de longitud. La endogamia reciente mostró que, en individuos altamente endogámicos, los espermatozoides presentaban un patrón hiperactivo incrementado durante la primera hora luego del descongelado. Dicho patrón podría comprometer la capacidad fertilizante en estadios tardíos, afectando así la fertilidad. Por otro lado, la depresión endogámica cromosómica mostró resultados discordantes a los encontrados en el análisis por categoría de longitud, siendo mayor el patrón hiperactivo en individuos con baja consanguinidad en todos los tiempos estudiados. Por último, el estudio de las regiones en homocigosis teniendo en cuenta varias razas, permitió diferenciar el efecto de las regiones en homocigosis que son propias de la raza, de aquellas involucradas en la depresión endogámica. Este estudio sugiere que el análisis por categoría de longitud resulta más fiable y tiene mayor respaldo teórico que el análisis de depresión endogámica cromosómica. No obstante, se precisan más análisis con un mayor número de muestras para validar lo encontrado en este capítulo.

CAPÍTULO 4

Estudio del efecto de la endogamia en la variación de parámetros cinemáticos en el tiempo en toros Retinta

Introducción

La evaluación de la calidad espermática es un requisito indispensable para determinar la fertilidad de un toro antes de ser usado como reproductor y/o donante de esperma (Vincent y col., 2014; Yániz y col., 2017). En esta evaluación, los caracteres más comúnmente examinados incluyen: el volumen de eyaculado, la concentración espermática, la motilidad (total y progresiva), la morfología, y la integridad de las membranas plasmática y acrosómica, entre otros (Kastelic y Thundathil, 2008; Chenoweth y McPherson, 2016) . Aunque estos caracteres son de gran utilidad en los centros de inseminación, Vincent y col. (2014) plantearon la necesidad de incluir un test de longevidad de al menos dos horas luego del descongelado, lo cual permitiría determinar qué poblaciones de espermatozoides son viables en el tiempo luego de la descongelación, ya que muestras seminales con daño criogénico pueden perder su viabilidad rápidamente (Barth, 1993).

Importancia de la dinámica del movimiento espermático

La longevidad espermática caracteriza la capacidad de los espermatozoides para mantener sus patrones de movimiento durante un cierto período. Este hecho es fundamental, ya que su objetivo final (la fertilización) requiere el poder progresar a través del tracto reproductivo hasta lograr alcanzar el ovocito, lo cual demanda un movimiento continuo por periodos prolongados (Alavioon y col., 2019). En la actualidad, la longevidad espermática es mayormente determinada mediante ensayos *in-vitro* que evalúan la habilidad del esperma para mantenerse en movimiento durante una incubación fisiológica, a lo largo de una serie de tiempos preestablecidos (Peña y col., 2003; Diniz y col., 2020). Si bien no es considerado como rutinario, este ensayo es

particularmente importante en toros que participan en programas de inseminación artificial con semen crio-preservedo, debido al efecto negativo que suele producir esta práctica en comparación con muestras de semen fresco (Underwood y col., 2010; Ahmad y col., 2015). Si bien la mayor parte de las metodologías empleadas para mejorar la calidad del semen congelado se basan hoy en día en el uso de diferentes protocolos de crio-preservedación y diluyentes espermáticos (Rurangwa y col., 2001; Celeghini y col., 2008; Mocé y col., 2010; Nagata y col., 2019), existen indicios que el efecto del individuo (componente genético) puede tener una cierta influencia. Sin embargo, este efecto debe evaluarse mediante un análisis sistemático de longevidad espermática, en los que se estudie la evolución de las características cinemáticas (velocidades y movimientos de la cabeza) a lo largo del tiempo, los cuales son actualmente escasos.

Endogamia molecular, a partir de ROH

El estudio del efecto de la consanguinidad sobre los parámetros espermáticos puede ayudar a optimizar la predicción de la capacidad reproductiva animal y a mejorarla a través de selección genética. Estudios anteriores han demostrado que los niveles de consanguinidad superiores a cierto umbral tienen un efecto negativo en la calidad espermática (Ferenčaković y col., 2017; Terán y col., 2021). En consonancia con dichos estudios, en esta tesis se ha demostrado que la estimación del nivel de consanguinidad individual debería ser realizada desde un enfoque genómico-topológico basado en ROH, teniendo en cuenta no solo el nivel de endogamia, sino también su localización. Tal es así, que actualmente esta aproximación es la más utilizada para determinar el efecto de la endogamia sobre diversos caracteres productivos en animales domésticos (McQuillan y col., 2008; Ferenčaković y col., 2013; Gurgul y col., 2016; Szmatoła y col., 2016; Martikainen y col., 2018; Modiba y col., 2022). Además, la evaluación de depresión endogámica basada en ROH posee la ventaja adicional de poder diferenciar el efecto producido

por la endogamia ancestral o reciente, mediante el análisis de ROH de diferente tamaño, que pueden tener efectos fenotípicos muy diversos.

El objetivo de este capítulo fue determinar y cuantificar la existencia de depresión endogámica en la longevidad espermática de toros Retintos producida por el aumento de la endogamia a nivel cromosómico. Se evaluó también el efecto diferencial que producen la endogamia ancestral y reciente sobre el mismo grupo de caracteres. Para ello, se utilizó un enfoque que combina la obtención de datos cinemáticos mediante el sistema CASA, un modelo autoregresivo de base cuantitativa para estimar fenotipos espermáticos a partir de dichos datos, y la determinación de los niveles de consanguinidad individual mediante el análisis de ROH.

Materiales y métodos

Muestras

Se analizaron muestras de semen crio-preservado de 53 toros pertenecientes al programa de cría de la Asociación Nacional de Criadores de Ganado Selecto de Raza Retinta (ACRE). Los individuos fueron seleccionados en base a su influencia en el pool génico de la población, así como también a su baja relación de parentesco. Las muestras de semen fueron recolectadas mediante monta natural con vagina artificial en presencia de vacas con celo inducido. Todas ellas fueron colectadas y congeladas en las primaveras de sus respectivos años, a partir de toros de 24 meses de edad, y siguiendo los protocolos estandarizados del programa de conservación reproductiva de la raza Retinta (Terán y col., 2021) en el centro reproductivo CENSyRA (Badajoz, España).

Genotipado de animales

Los individuos fueron genotipados utilizando el *array* de alta densidad Axiom Genome-Wide BOS 1 Array (Affymetrix Inc., 670.685 SNPs) siguiendo los protocolos del fabricante. Los

genotipos se obtuvieron analizando los archivos CEL (datos crudos) utilizando el flujo de trabajo “*best genotyping practices*” en el software Axiom Analysis Suite V5.0 (Scientific, 2020). Los parámetros de calidad utilizados fueron los recomendados por defecto por el fabricante: DQC > 0,97, y un umbral de *call rate* por individuo y por SNP de 0,95. No se aplicó el filtro de frecuencia alélica menor (MAF), ya que podría sesgar las estimaciones de endogamia genómica individual en matrices de SNP de alta densidad (Meyermans y col., 2020). Tras el procesamiento, quedaron 624.737 marcadores para su posterior análisis. La manipulación y control de calidad de genotipos se realizó con PLINK V1.9 (Chang y col., 2015).

Diseño experimental

Los fenotipos espermáticos de cada individuo fueron obtenidos mediante un ensayo de longevidad que incluyó 6 determinaciones cinemáticas por eyaculado de acuerdo al siguiente esquema: T0: 5 minutos después de la descongelación (tras equilibrar la dilución) y T1 a T5: cinco evaluaciones adicionales cada 60 minutos respectivamente. Cada pajuela fue descongelada durante 30 segundos a 37°C en baño termostático. A continuación, se ajustó la concentración de esperma a 25 millones/ml en diluyente Biladyl® (Minitübe, Tiefenbach, Alemania), dejándose equilibrar durante 5 minutos a 37°C en una placa Nunclon (Nunc, Roskilde, Dinamarca) de cuatro pocillos, tras lo cual se realizaron las 6 determinaciones antes mencionadas (T0 a T5). Sólo se consideraron para el análisis de datos las muestras que presentaban un Motilidad Total > 60% en T0 y una Motilidad Progresiva > 30% en el resto de los puntos temporales.

Evaluación de motilidad espermática

En total, se realizaron 636 evaluaciones (106 pajuelas, dos por toro (n=53), 6 determinaciones por pajuela) utilizando el sistema de análisis espermático asistido por computadora CASA (*Sperm Class Analyzer* 5.4.0.0, Microptic SL, Barcelona, España) en un

microscopio Olympus BH-2 144 (Olympus, Tokio, Japón) provisto de una cámara Makler® precalentada. En cada evaluación se determinaron 3 parámetros cinemáticos asociados a la velocidad: velocidad curvilínea (VCL), velocidad en línea recta (VSL) y velocidad media de la trayectoria (VAP) y dos parámetros cinemáticos relacionados con el movimiento de la cabeza: amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza (ALH) y frecuencia de cruce de la cabeza con respecto a su trayectoria promedio (BCF). En cada determinación, se analizó un mínimo de 500 espermatozoides recogidos de dos gotas y tres campos microscópicos por gota (6 determinaciones por cada evaluación; 3.816 en total). En cada una de ellas se evaluó un video de 1 segundo de duración durante el cual se capturaron 25 imágenes.

Pseudo-fenotipos

Se estimaron cinco pseudo-fenotipos diferentes (VCL_{PSe} , VSL_{PSe} , VAP_{PSe} , ALH_{PSe} , BCF_{PSe}) por individuo utilizando un modelo lineal de efecto mixto con una estructura de correlación entre mediciones por tiempo que incluyó las diferentes medidas por individuo y una función de varianza por tiempo. El modelo fue establecido con el tiempo como efecto fijo y el individuo como efecto aleatorio. Los coeficientes del efecto aleatorio de cada individuo fueron utilizados como valor pseudo-fenotípico individual.

El modelo de regresión lineal mixta fue el siguiente:

$$Y_{ij} = (\beta_0 + b_{0i}) + (\beta_1 + b_{1i}) \times t_{ij} + e_{ij}$$

donde Y_{ij} es la respuesta del individuo i en el tiempo j , β_0 es la respuesta media, promediada entre todos los individuos en el momento cero; y β_1 es la tasa media de cambio en la respuesta media por unidad de tiempo. Asimismo, b_{0i} es la diferencia entre la ordenada al origen β_0 de la población y la ordenada al origen para el individuo i , y b_{1i} es la diferencia entre la pendiente β_1 de la

población y la pendiente para el individuo i . Por otro lado, t_{ij} es el tiempo de la medida en el individuo i en el momento j . Finalmente, e_{ij} es el error residual de las respuestas individuales.

Este análisis se realizó utilizando un modelo lineal de efectos mixtos ajustado por Máxima Verosimilitud Restringida (REML) implementado en la librería *nlme* (Pinheiro y col., 2013) en R V4.1.

Análisis de coeficientes de endogamia basados en ROH (F_{ROH})

Para determinar el nivel de endogamia molecular a partir de ROH (F_{ROH}), se utilizó el algoritmo de "*consecutive.runs*" del paquete detectRUNS (Marras y col., 2015) implementado en R. La configuración de los parámetros empleada fue: longitud mínima 1Mb, 6 categorías de longitud (1–2Mb, 2–4Mb, 4–8Mb, 8–16Mb, >8Mb y >16 Mb), número de SNP heterocigotos (nH) y *missing* (nM) permitidos por categoría de longitud obtenidos a partir de las siguientes fórmulas:

$$nH = \frac{mL}{dS} \times eG$$

$$nM = \frac{mL}{dS} \times mG$$

donde mL es la longitud media de los ROH, dS es la distancia media entre los SNP, eG es la tasa de error de genotipado (fijada en un 0,25% según los procedimientos estándar de Axiom™), y mG es la tasa promedio de genotipos faltantes en la población (Tabla Suplementaria 1 del capítulo 2). A continuación, los ROH con regiones superpuestas dentro del mismo individuo se fusionaron utilizando la función "*reduce*" de la librería de *GenomicRanges* (Lawrence y col., 2013). Finalmente, los F_{ROH} se calcularon como el porcentaje de la longitud del genoma cubierto por fragmentos de ROH por individuo.

Adicionalmente se estimó el F_{ROH} total por cada cromosoma, así como el F_{ROH} por categoría de longitud, considerándose fragmentos ancestrales, aquellos entre 1-2 Mb (correspondientes a 50 generaciones atrás), mientras que los ROH >8 Mb y 16 Mb fueron considerados como recientes (producidos aproximadamente en las últimas seis y tres generaciones respectivamente).

Estudio del efecto de la endogamia

El efecto de la endogamia fue evaluado mediante la determinación del coeficiente de correlación por rangos de Spearman, contrastando los diferentes valores de F_{ROH} total, por categoría de longitud y por cromosoma con los correspondientes pseudo-fenotipos para cada variable.

Resultados

Caracterización de F_{ROH} por cromosoma y por categoría de longitud

Los valores promedio de F_{ROH} por cromosoma y por categoría de longitud de la población se resumen de las Tablas 1 y 2, respectivamente. Los coeficientes F_{ROH} por individuo se resumen en la Tabla Suplementaria 2.

La cantidad de ROH detectados por cromosoma estuvo correlacionada con el tamaño del cromosoma ($r=0,93$). Por ejemplo, BTA1, el cromosoma más largo, presentó 411 ROH en total, mientras que BTA27, uno de los cromosomas más pequeños, presentó 127 ROH. Por otro lado, los valores de F_{ROH} por cromosoma no estuvieron correlacionados con su tamaño. Por ejemplo, BTA1 presentó un F_{ROH} promedio de 0,1106, cercano al promedio total del genoma (0,1041), siendo BTA14, con una longitud equivalente a la mitad de BTA1, el que presentó el valor más alto (0,1721). En dicho cromosoma, un individuo en particular presentó un F_{ROH} de 0,8182, el cual fue

producido por solo 3 fragmentos que cubrieron en gran proporción el cromosoma (ver individuo 31, Figura 1). En este sentido, varios individuos presentaron ROH largos en BTA14, lo cual concuerda con el análisis del capítulo 3, ya que la raza presentó una zona enriquecida en fragmentos HBD en esa región genómica, particularmente en las posiciones comprendidas entre las 24 y 26 Mb aproximadamente.

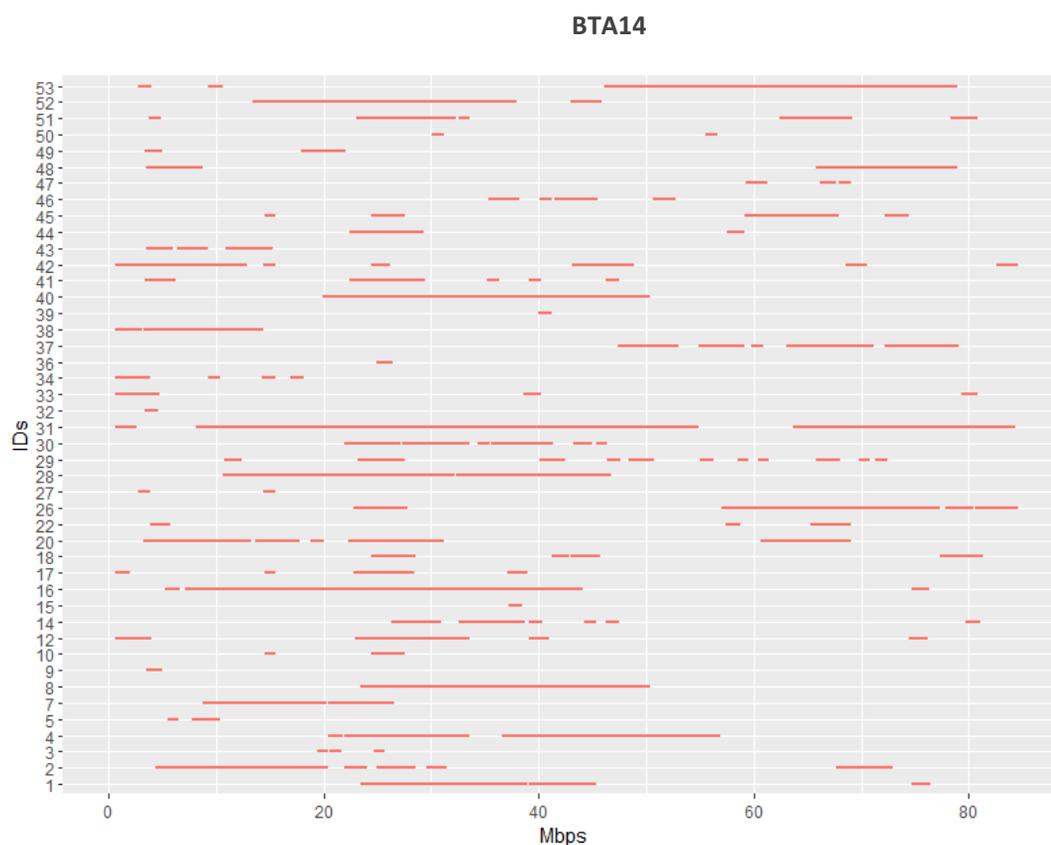


Figura 1. Distribución de ROH por individuo en BTA14 en toros Retinta. IDs: identificación de individuos; Mbps: posición dentro del cromosoma expresada en megabases.

Solo individuos que presentaron al menos un ROH son representados en la figura.

También quedó en evidencia la existencia de un amplio rango de variabilidad de F_{ROH} por cromosoma con valores que fueron desde 0 hasta valores cercanos a 1 (individuo 31, BTA14,

Figura 1). Por ejemplo, si bien algunos individuos presentaron F_{ROH} cercanos a 0,5 en BTA25, casi la mitad de ellos (24/53) no mostraron ningún ROH ($F_{ROH}=0$), con un valor promedio de 0,0979, pero una altísima variabilidad (Figura 2). Esta existencia de patrones altamente variables queda también manifestada por el hecho que, en la mayoría de los cromosomas, el desvío estándar fue mayor que la media (Tabla 1).

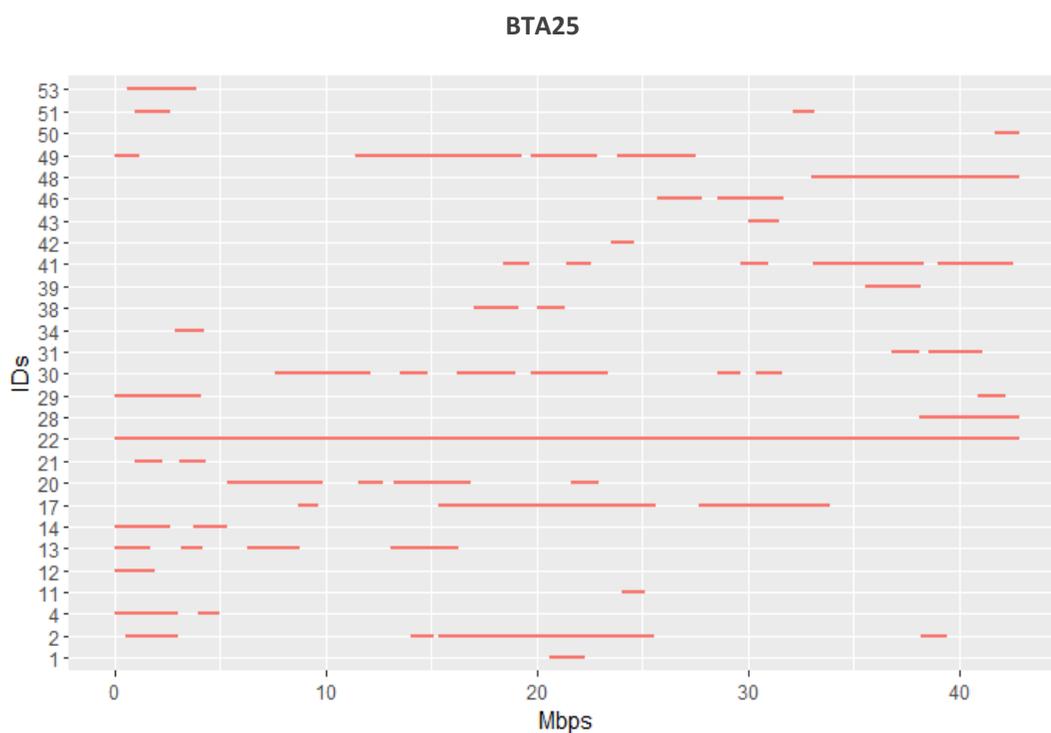


Figura 2. Distribución de ROH por individuo en BTA25 en toros Retinta. IDs: identificación de individuos; Mbps: posición en Megabases dentro del cromosoma. Solo individuos que presentaron al menos un ROH son representados en la figura.

Respecto al análisis realizado por agrupando los F_{ROH} por categoría de longitud, las más representadas fueron: $F_{ROH1-2Mb}$ y $F_{ROH>8Mb}$.

Tabla 1. Estadística descriptiva de F_{ROH} por cromosoma en la población de toros Retinta

F_{ROH}	N	Media \pm Desvío estándar	Mínimo	Máximo
Total	53	0,1041 \pm 0,0709	0	0,2876
BTA1	53	0,1106 \pm 0,1471	0	0,7977
BTA2	53	0,1083 \pm 0,1280	0	0,5469
BTA3	53	0,0978 \pm 0,1215	0	0,5261
BTA4	53	0,0950 \pm 0,1388	0	0,7747
BTA5	53	0,1097 \pm 0,1091	0	0,4764
BTA6	53	0,1172 \pm 0,1353	0	0,5411
BTA7	53	0,1080 \pm 0,1430	0	0,642
BTA8	53	0,1139 \pm 0,1503	0	0,6954
BTA9	53	0,1191 \pm 0,1521	0	0,5532
BTA10	53	0,0957 \pm 0,1118	0	0,4379
BTA11	53	0,1104 \pm 0,1572	0	0,7576
BTA12	53	0,1090 \pm 0,1499	0	0,6899
BTA13	53	0,1566 \pm 0,2011	0	0,8202
BTA14	53	0,1721 \pm 0,1717	0	0,8182
BTA15	53	0,0961 \pm 0,1346	0	0,6127
BTA16	53	0,0641 \pm 0,0813	0	0,4853
BTA17	53	0,1029 \pm 0,1770	0	0,8921
BTA18	53	0,0885 \pm 0,1275	0	0,6407
BTA19	53	0,1044 \pm 0,1546	0	0,9006
BTA20	53	0,0726 \pm 0,1080	0	0,4777
BTA21	53	0,0888 \pm 0,1281	0	0,6493
BTA22	53	0,1271 \pm 0,1871	0	0,873
BTA23	53	0,0924 \pm 0,1437	0	0,6139
BTA24	53	0,1074 \pm 0,1705	0	0,8428
BTA25	53	0,0979 \pm 0,1787	0	0,9992
BTA26	53	0,0826 \pm 0,1512	0	0,6746
BTA27	53	0,0917 \pm 0,1559	0	0,7823
BTA28	53	0,0793 \pm 0,1179	0	0,4081
BTA29	53	0,1001 \pm 0,1560	0	0,7514

Los primeros corresponderían a eventos de endogamia ancestrales (ocurridos aproximadamente 50 generaciones atrás), mientras que los segundos corresponden a eventos de endogamia ocurridos recientemente, durante las últimas seis generaciones. A partir de estos

resultados se puede deducir que la población conserva regiones en homocigosis derivadas probablemente de los procesos de selección asociados a la creación de la raza, previas incluso a la constitución del libro genealógico, pero también ha experimentado eventos recientes de cruces endogámicos, probablemente debido a la falta de control de la relación de parentesco en los cruzamientos o bien a la búsqueda de los ganaderos de homogeneizar sus rodeos.

Tabla 2. Estadística descriptiva de F_{ROH} por categoría de longitud en toros Retinta

Categoría de longitud de F_{ROH}	N	Media \pm Desvío Estándar	Mínimo	Máximo
1-2 Mb	53	0,0323 \pm 0,0223	0,0057	0,0937
2-4 Mb	53	0,0156 \pm 0,0112	0,0006	0,0431
4-8 Mb	53	0,0181 \pm 0,0150	0	0,0548
8-16 Mb	53	0,0204 \pm 0,0236	0	0,1038
>8 Mb	53	0,0381 \pm 0,0425	0	0,1578
>16 Mb	53	0,0177 \pm 0,0235	0	0,0808

Pseudo-fenotipos espermáticos y efecto de la endogamia

En general, los pseudo-fenotipos mostraron alta variabilidad, con valores que variaron desde -14,38 a 17,39 para VCL, -11,47 a 10,09 para VSL, -11,49 a 10,91 para VAP, -0,75 a 1,02 para ALH y -1,23 a 2,09 para BCF (Tabla Suplementaria 1), demostrando una amplia variabilidad en los patrones de motilidad espermática entre los individuos.

Las correlaciones estimadas entre los valores de endogamia, total, por cromosoma y por categoría de largo de ROH, y los pseudo-fenotipos de las diferentes variables cinéticas se muestran en la Tabla 3. En el análisis general, solo fue observado un efecto del aumento del nivel de consanguinidad en el pseudo-fenotipo de BCF. Por el contrario, el análisis por cromosoma

identificó una correlación significativa entre los valores de F_{ROH} en siete cromosomas (BTA5, BTA6, BTA7, BTA8, BTA15, BTA16 y BTA19) y tres de las cinco variables estudiadas (VCL, ALH y BCF), cuyo aumento suele asociarse a movimientos de hiperactivación.

Tabla 3. Coeficientes de correlación de Spearman entre F_{ROH} y pseudo-fenotipos, con sus respectivos valores de significancia. Las categorías y campos ausentes no presentaron correlaciones significativas.

Cromosoma/ Categoría	VCL	ALH	BCF	p
BTA5			0,38	0,0067
BTA6	0,37			0,0081
BTA6		0,35		0,0114
BTA7	0,28			0,0478
BTA7		0,35		0,0123
BTA7			0,36	0,0107
BTA8			0,32	0,0258
BTA15			0,34	0,0163
BTA16	0,39			0,0050
BTA16		0,38		0,0063
BTA29			0,29	0,0437
F_{ROH} total			0,31	0,0268
F_{ROH} 2-4Mb			0,29	0,0320
F_{ROH} 4-8Mb			0,35	0,0082
F_{ROH} 8-16Mb			0,37	0,0061
F_{ROH} >8 Mb			0,33	0,0170
F_{ROH} >16 Mb			0,29	0,0359

VCL: Velocidad curvilínea ($\mu\text{m/s}$); ALH: amplitud del desplazamiento lateral (μm); BCF: Frecuencia del movimiento flagelar (Hz). Los valores expresados tienen una significancia de al menos $p < 0,05$

Finalmente, se identificó una marcada correlación del nivel de endogamia sobre el pseudo-fenotipo de BCF para cinco de las seis categorías de longitud de ROH analizadas, con excepción de la categoría 1-2 Mb. En todos los casos, la correlación fue positiva, sugiriendo que el aumento de la endogamia incrementa el porcentaje de células que presentan un movimiento rápido no progresivo, característico de los espermatozoides hiperactivos.

Discusión

Un factor importante que determina el éxito en la fertilización es la habilidad del espermatozoide para desplazarse progresivamente a través del tracto reproductivo, alcanzando en tiempo y forma el sitio de fecundación donde se encuentra el ovocito. Si bien es conocido que esta capacidad puede verse afectada por la crio-preservación, la influencia que puede ejercer sobre ella el aumento de la consanguinidad aún no ha sido estudiada en profundidad en animales domésticos. En este capítulo se buscó determinar el efecto de distintos niveles de endogamia en la variación de parámetros cinemáticos a lo largo del tiempo en muestras crio-preservadas de semen de bovinos. Aunque existen estudios similares que analizan la longevidad espermática, este es el primer estudio que intenta determinar el potencial efecto que ejerce la consanguinidad en esta característica, utilizando una combinación de datos genómicos y evaluaciones objetivas realizadas mediante CASA.

La variabilidad en la endogamia molecular

El estudio la endogamia molecular por cromosoma y por categoría de longitud demostró una gran variabilidad entre individuos, coincidente con lo planteado a lo largo de esta tesis, respecto a la abundancia y distribución de los ROH a lo largo del genoma de cada individuo. Sin embargo, también se ha detectado la existencia de algunas regiones con ROHi, como es el caso de BTA14 las cuales pueden estar asociadas al proceso selectivo de la raza (Capítulo 3). Por otro

lado, también se evidenció una amplia variabilidad por categoría de largo, siendo las de 1-2Mb y >8Mb, las que mostraron mayor proporción de ROH. Las primeras se asocian con fragmentos que se mantuvieron por el proceso selectivo de la raza, mientras que las últimas fueron producidas por cruzamientos recientes realizados sin tener en cuenta el nivel de parentesco entre los individuos.

Depresión endogámica por cromosoma y categoría de longitud

A nivel cromosómico, se detectó una correlación en tres caracteres: VCL, ALH y BCF y siete cromosomas: BTA5, BTA6, BTA7, BTA8, BTA15, BTA16, BTA29. En todos los casos, la correlación fue moderada (rango de 0,29 a 0,39) y de signo positivo. Anteriormente, Pilon y col. (2021), plantearon la existencia de un efecto diferencial por cromosoma, indicando que algunos de ellos contribuyen en mayor medida al efecto de la depresión endogámica en caracteres productivos que otros. Nuestro estudio concuerda con este trabajo ya que los resultados muestran una variación en la correlación entre un mismo carácter y diferentes cromosomas, como por ejemplo BCF presentó una correlación con BTA5 igual a 0,38, mientras que la correlación en BTA29 fue menor, 0,29. Por su parte la correlación con VCL en BTA7 fue de 0,28 mientras que en BTA6 y BTA16 fue de 0,37 y 0,39, respectivamente. Estas diferencias, aunque pequeñas, en los niveles de correlación podrían deberse a diferente contribución de cada cromosoma al carácter estudiado. Sin embargo, es necesario tener en cuenta la inclusión de fragmentos cortos en la determinación de los coeficientes de correlación, que como se viene planteando en esta tesis, pueden interferir en la estimación de la depresión por endogamia.

Al analizar la depresión endogámica teniendo en cuenta las diferentes categorías de longitud, varias de ellas mostraron correlaciones positivas con el pseudo-fenotipo BCF. Sin embargo, la categoría $F_{ROH\ 1-2Mb}$, correspondiente a eventos de consanguinidad producidos

aproximadamente entre 50 y 100 generaciones atrás, periodo asociado al origen propio de la raza, fue la única en la que no se encontró correlación con la endogámica. Por el contrario, la depresión endogámica en la categoría de $F_{ROH} < 8-16 \text{ Mb}$ (correspondiente a endogamia reciente; ROH producidos entre tres y seis generaciones atrás) fue la que presentó el mayor valor de correlación (0,37). Curiosamente, la categoría de F_{ROH} más reciente, $F_{ROH} > 16 \text{ Mb}$ (ROH producidos en las últimas tres generaciones) mostró un valor de correlación (0,29) menor, sugiriendo que tiene un menor efecto fenotípico. Sin embargo, esto podría deberse a un efecto de muestreo ya que solo la mitad de la población presentó un valor de F_{ROH} mayor a 0 en esta categoría. Además, el análisis de correlación realizado utilizando la categoría de $F_{ROH} > 8 \text{ Mb}$, demostró un valor mayor (0,33), lo cual refuerza la hipótesis del posible “fallo muestral” observado en la categoría de F_{ROH} más reciente.

El efecto de la endogamia en la dinámica del movimiento espermático

Los valores de VCL representan la velocidad del espermatozoide teniendo en cuenta todo el trayecto de su recorrido, mientras que ALH representa la amplitud del desplazamiento de su cabeza. Valores elevados de ambas variables indicarían un movimiento rápido, pero poco progresivo. Ambas variables fueron correlacionadas con la endogamia a nivel cromosómico. De la misma manera, se observó un efecto tanto a nivel cromosómico como de categoría de longitud sobre BCF, aunque las correlaciones fueron mucho más moderadas. En todos los casos, se observó que la relación entre sus valores y los coeficientes de consanguinidad fue positiva. Esto sugiere que el aumento de la consanguinidad tendería a producir un patrón de motilidad de tipo hiperactivado, como fue descrito en el capítulo anterior. Durante el proceso de fertilización, los espermatozoides deben atravesar el oviducto femenino en un movimiento sinuoso, por lo cual, se ha planteado que este tipo de movimiento rápido y errático podría favorecer su paso a través del mismo (Smith y Yanagimachi, 1991). De modo similar, fue demostrado que este patrón favorece el proceso de atravesar la zona pelúcida del ovocito (Stauss y col., 1995), debido

principalmente a la magnitud de la fuerza ejercida por el flagelo durante ese tipo de movimiento. Sin embargo, los espermatozoides que experimentan hiperactivación demandan altos requerimientos energéticos, por lo que su inicio y mantenimiento ocurre en ciertos momentos específicos, para evitar que las reservas energéticas de los espermatozoides sean consumidas antes de tiempo y la capacidad de fertilización se vea disminuida (Visconti, 2012). Estos resultados concuerdan con un estudio previo también realizado en la raza Retinta, en el cual se analizó la endogamia empleando datos de pedigrí, donde se demostró que la endogamia provoca un patrón de hiperactivación temprano en los espermatozoides (Dorado y col., 2015).

Los hallazgos de este capítulo confirman el efecto de la endogamia en caracteres de dinámica espermática. En el capítulo anterior se pudieron determinar las ROHi que podrían mediar la expresión de patrones de motilidad espermática, siendo, además, el análisis de la endogamia reciente el que resultó más informativo, involucrando genes previamente relacionados al movimiento espermático. En este sentido, Antonios y col. (2021), estudiaron el efecto de la endogamia ancestral y reciente sobre la motilidad espermática en ovinos, encontrando un efecto negativo de la endogamia reciente, mientras que la endogamia ancestral no afectó el carácter. Por su parte, Makanjuola y col. (2020), encontraron que la endogamia reciente tenía efectos perjudiciales en caracteres de producción y fertilidad en toros Holstein, mientras que la endogamia ancestral mostraba ser favorable. En ambos casos, las hipótesis contrastadas por estos reportes coinciden con los resultados obtenidos en este capítulo.

Conclusión

Este estudio demostró la presencia de depresión endogámica a nivel cromosómico en varios caracteres asociados la motilidad espermática. En particular, el incremento de la endogamia se relacionó con un aumento de espermatozoides con movimientos rápidos no

progresivos, similares a los observados en la hiperactivación. A nivel de categoría de longitud sugirió un efecto dado por el aumento de la endogamia reciente en la variable BCF, mientras que la endogamia ancestral no reveló ningún efecto. El aumento de la endogamia puede afectar la cinemática espermática produciendo un patrón de hiperactivación temprano que condiciona la longevidad espermática.

CAPÍTULO 5

Estudio preliminar de las regiones genómicas asociadas con la variación de los parámetros cinemáticos en el tiempo en toros Retinta.

Introducción

GWAS y cinemática espermática

El creciente uso de datos genómicos en investigación animal ha ayudado a comprender, de manera más precisa el control genético existente en las diversas vías metabólicas implicadas en caracteres productivos y reproductivos de las especies domésticas de producción (Verardo y col., 2016; Melo y col., 2017). Este tipo de hallazgos se ha logrado principalmente por el uso de estudios de asociación de genoma completo (GWAS), los cuales son una de las herramientas más útiles para asociar un fenotipo concreto a una o varias regiones del genoma (Sharma y col., 2015). Existen numerosos estudios de este tipo enfocados en caracteres de calidad espermática en bovinos (Hering y col., 2014; Qin y col., 2017; Sweett y col., 2020). Si bien algunos de ellos han estudiado la componente genética que controla la resistencia de los espermatozoides a la crio-preservación (Roca y col., 2006; Kamiński y col., 2016), ninguno ha considerado, hasta la fecha, la longevidad espermática y, particularmente, la dinámica del movimiento de los espermatozoides crio-preservados como fenotipo. Siendo que este carácter ha sido asociado a la fertilidad del bovino en condiciones de laboratorio, el análisis de su arquitectura genética mediante estudios de asociación de genoma completo podría tener un valor productivo interesante.

En la actualidad, uno de los factores limitantes de los estudios de GWAS centrados en rasgos reproductivos es la falta de bases de datos fenotípicos de tamaño adecuado y fiable (Laseca y col., 2021). Esto se debe principalmente a las dificultades técnicas y costos que implican llevar a cabo un análisis fenotípico, sobre todo en grandes mamíferos como el bovino. A su vez, existen ciertos caracteres complejos que son difíciles de describir utilizando un único valor, como por

ejemplo la variación de un carácter en el tiempo, como es el caso de la longevidad espermática. Como se demostró en el capítulo 4, este problema puede mitigarse empleando modelos lineales de efecto mixto (MLM), que no solo permiten determinar la variabilidad individual, sino además permite modelar la relación entre las mediciones de un mismo individuo y la variación de cada punto de tiempo como funciones de varianzas independientes (Fitzmaurice y Ravichandran, 2008).

El objetivo de este capítulo fue identificar SNPs asociados a las variaciones cinemáticas en el tiempo en muestras de semen descongeladas provenientes de la raza Retinta. Adicionalmente, se realizó un estudio de ontología génica *in silico* con el objetivo de identificar genes potencialmente asociados al control genético de dichos caracteres.

Materiales y métodos

Determinación de pseudo-fenotipos espermáticos y genotipado de los animales

En este estudio se utilizaron los pseudo-fenotipos (VCL_{PSe} , VSL_{PSe} , VAP_{PSe} , ALH_{PSe} , BCF_{PSe}) obtenidos de las 53 muestras de semen crio-preservado de toros de raza Retinta pertenecientes al programa de cría de la Asociación Nacional de Criadores de Ganado Selecto de Raza Retinta (ACRE) obtenidos en el capítulo 4. Además, se utilizaron los genotipos obtenidos a partir de SNP-*array* de alta densidad (Axiom Genome-Wide BOS 1 Array) antes mencionados. Sin embargo, solo aquellos marcadores con un *Call Rate* > 0,9, frecuencia alélica menor (MAF) > 0,05 y (des)Equilibrio de Hardy-Weinberg < 10^{-4} fueron retenidos para su posterior análisis (n=364.861). La manipulación y control de calidad de genotipos se realizó con PLINK V1.9 (Chang y col., 2015).

GWAS

Los pseudo-fenotipos de cada parámetro para cada individuo fueron empleados junto a los datos genómicos para realizar un GWAS utilizando el siguiente modelo lineal mixto (MLMA):

$$Y = a + bx + g + e$$

donde **Y** es el pseudo-fenotipo analizado, **a** es la media, **b** es el efecto aditivo (efecto fijo) del SNP que se va a probar para la asociación (test alélico aditivo), **x** es la variable indicadora del genotipo del SNP codificada como 0, 1 o 2 (para el genotipo aa, Aa y AA, respectivamente), **g** es el efecto poligénico (efecto aleatorio), es decir, el efecto acumulado de todos los SNPs (tal como lo capta la GRM calculada utilizando todos los SNPs) y **e** es el error residual. Además, se incluyó la matriz de relaciones genéticas (GRM) como efecto aleatorio para corregir el efecto producido por la posible estructura de la población. A su vez, para determinar la posible existencia de inflación genómica en el conjunto de datos, mediante la estimación del factor de inflación λ como la mediana o la media de los estadísticos de la prueba χ^2 dividida por su mediana o media teórica bajo la distribución nula (Devlin y Roeder, 1999). Por último, los valores de significancia p en bruto se corrigieron utilizando el procedimiento de pruebas múltiples SGoF (Carvajal-Rodríguez y col., 2009) a nivel cromosómico. Todos aquellos marcadores asociados con un umbral de nivel de significación mínimo de 1×10^{-4} , fueron considerados como potencialmente asociados al carácter en cuestión. Los cálculos de cada GWAS fueron realizados utilizando el software GCTA (Yang y col., 2011). La visualización y la gestión de los datos se realizaron utilizando los paquetes *tidyverse* (Wickham y col., 2019) y *qqman* (Turner, 2014) de la plataforma estadística R.

Genes candidatos

Posteriormente, se determinaron todos los genes que estuvieron localizados en el interior de una ventana genómica localizada a ± 100 kb de la posición de cada uno de los SNPs significativos en el estudio GWAS, utilizando la herramienta *Variant Effect Predictor* de *Ensembl* (McLaren y col., 2016), basado en la anotación del genoma bovino ARS-UCD1.2 (Rosen y col., 2020). El tamaño de la ventana fue seleccionado en base al r^2 existente (0,15-0,20 en la población

bovina de acuerdo a O'Brien y col. (2014)), en la cual el DL se mantiene dentro de los valores aceptables. Finalmente, la función de cada gen y su implicancia en la funcionalidad y motilidad espermática se analizó mediante una revisión de la literatura más reciente.

Resultados

Los resultados revelaron la presencia de 17 SNPs significativamente asociados con los rasgos analizados, localizados en cinco cromosomas (Tabla 1). Sin embargo, tres marcadores localizados en BTA1 mostraron una alta correlación entre sí, probablemente atribuida al desequilibrio de ligamiento: AX-18363320, AX-18363364 y AX-18363341 ($r^2 > 0,61$). Por tal motivo sólo se retuvo uno de ellos (AX-18363320) para el análisis posterior, reduciendo el número final de SNP significativos a 15 (Figuras 1A, B, C, D, E). Cuatro de las variables estudiadas (VCL, VSL, VAP y BCF, Figuras 1A, 1B, 1C y 1E, respectivamente) mostraron regiones asociadas en BTA5, mientras que VAP y VSL mostraron asociaciones significativas en un cromosoma adicional (BTA1 y BTA 10, respectivamente). Por otro lado, los caracteres VCL y BCF mostraron marcadores asociados en dos cromosomas adicionales además de BTA5: BTA10 y BTAX en el caso de VCL; y BTA10 y BTA11 en el caso de BCF. Solo un marcador situado en BTA11 se asoció con ALH. A su vez, ninguno de los cinco GWAS independientemente realizados demostró valores de λ que sugieran la existencia de inflación genómica (rango λ , 0,99 a 1,04).

Determinación de genes candidatos

Los resultados del análisis funcional revelaron 23 genes en las regiones genómicas asociadas a los SNPs significativos (Tabla 1). De ellos, sólo ocho fueron relacionados previamente con procesos o funciones metabólicas del esperma en mamíferos (*ITPR2*, *VCPKMT*, *EPHB1*, *PLD1*, *PRIM1*, *HSD17B6*, *PTGES3* y *RORA*). Algunos de los genes estuvieron relacionados con la espermatogénesis, como, por ejemplo, los genes *EPHB1* y *RORA*, ambos relacionados con las

variables de velocidad, VAP y VCL, respectivamente. El primero codifica para un miembro de la familia de receptores tirosina quinasa, que desempeñan importantes funciones en procesos biológicos como, por ejemplo, la migración celular, habiendo sido asociado con el proceso de migración y comunicación celular durante la espermatogénesis (Guo y col., 2004); mientras que *RORA* ha sido implicado en la determinación de forma espermática ya que su sobreexpresión o ausencia de expresión se ha asociado con la presencia de espermátidas redondas (Yao y col., 2017) o cambios patológicos de la morfología testicular (Sayed y col., 2019).

Otro de los genes significativamente asociado a uno de los caracteres estudiados (VCL) fue *ITPR2*. Este gen codifica para el receptor inositol 1,4,5-trifosfato, un canal de Ca^{2+} que es activado por inositol trifosfato y regula el transporte de Ca^{2+} , que tiene un rol importante en la reacción acrosómica durante el proceso de capacitación espermática (Breitbart, 2002). Similarmente, el gen *PLD1* estuvo asociado con otra variable de velocidad VAP. Este gen, que codifica para fosfolipasa D1, ha sido asociado con la reacción acrosómica, ya que se demostró su presencia en la región acrosómica, y además es regulada por la proteinasa K, una proteína que interviene en la reacción acrosómica (Garbi y col., 2000).

También se encontraron genes que podrían controlar el desarrollo embrionario. Por ejemplo, el gen *VCPKMT*, cuyo SNP mostró significancia en BCF, codifica para una metiltransferasa que, aunque se expresa en muchos tejidos, estuvo asociada con la implantación del embrión en conejos (Sosa-Madrid y col., 2020); mientras que *HSD17B6*, que fue asociado significativamente a VSL, se encontró que participaba en la tasa de clivaje en embriones bovinos, afectando probablemente la regulación de las concentraciones de esteroides sexuales en el ovario y el testículo (Cochran y col., 2013); como se describió en ratones (Fomitcheva y col., 1998). Similarmente, el gen *PTGES3* codifica para una prostaglandina sintetasa que se expresa principalmente en el endometrio uterino (Seo y col., 2014).

Tabla 1. SNPs significativos y genes asociados por variable.

Cr	SNP	Posición	MAF	B	p ajustado	Gen	Variable	Función	Referencias
5	AX-26170728	83165869	0.38	-6.11	4×10^{-4}	<i>ITPR2</i>	VCL	Reacción acrosómica y motilidad espermática	(Walensky y Snyder, 1995; Ho y Suarez, 2001; Vervloessem y col., 2015)
10	AX-18811500	49550903	0.27	7.2	10^{-4}	<i>RORA</i>	VCL	Espermatogénesis	(Yao y col., 2017; Borowska y col., 2018; Sayed y col., 2019; Sayed y col., 2020)
10	AX-18835972	55772261	0.39	-6.77	6×10^{-4}	<i>UNC13C</i>	VCL		
10	AX-18835972	55772261	0.39	-6.77	6×10^{-4}	<i>RORA</i>	VCL	Espermatogénesis	(Yao y col., 2017; Borowska y col., 2018; Sayed y col., 2019; Sayed y col., 2020)
X	AX-28160310	31989486	0.5	4.13	2×10^{-4}	<i>IDS</i>	VCL		
5	AX-26066862	56661587	0.22	4.53	6×10^{-4}	<i>NACA</i>	VSL		
5	AX-26066862	56661587	0.22	4.53	6×10^{-4}	<i>HSD17B6</i>	VSL	Clivaje embrionario	(Fomitcheva y col., 1998; Cochran y col., 2013)
5	AX-26066862	56661587	0.22	4.53	6×10^{-4}	<i>PTGES3</i>	VSL	Motilidad espermática	(Seo y col., 2014)
5	AX-26066862	56661587	0.22	4.53	6×10^{-4}	<i>PRIM1</i>	VSL	Desarrollo embrionario	(Valcarce y col., 2013)
10	AX-18835972	55772261	0.39	-4.99	10^{-4}	<i>UNC13C</i>	VSL		
1	AX-18362592	95712251	0.47	4.68	8×10^{-4}	<i>PLD1</i>	VAP	Capacitación espermática e hipermotilidad	(Cohen y col., 2004)
1	AX-18362592	95712251	0.47	4.68	8×10^{-4}	<i>BTLA</i>	VAP		
1	AX-18211612	57238377	0.45	-4.72	8×10^{-4}	<i>ATG</i>	VAP		
1	AX-18211612	57238377	0.45	-4.72	8×10^{-4}	<i>BTL</i>	VAP		
1	AX-18211612	57238377	0.45	-4.72	8×10^{-4}	<i>CD200</i>	VAP		

1	AX-18362996	95806096	0.47	-4.24	9×10^{-4}	<i>PLD1</i>	VAP	Capacitación espermática e hipermotilidad	(Cohen y col., 2004)
1	AX-18363320	95895244	0.41	4.21	9×10^{-4}	<i>PLD1</i>	VAP	Capacitación espermática e hipermotilidad	(Cohen y col., 2004)
1	AX-18508853	134593499	0.23	-6.05	9×10^{-4}	<i>EPHB1</i>	VAP	Se expresa en testículos. Involucrado en la espermatogénesis	(Guo y col., 2004)
1	AX-18475179	126013421	0.28	4.95	9×10^{-4}	<i>U2SURP</i>	VAP		
1	AX-18475179	126013421	0.28	4.95	9×10^{-4}	<i>PAQR9</i>	VAP		
5	AX-26170728	83165869	0.37	-4.46	6×10^{-4}	<i>ITPR2</i>	VAP	Reacción acrosómica y motilidad espermática	(Walensky y Snyder, 1995; Ho y Suarez, 2001; Vervloessem y col., 2015)
11	AX-19076676	8944649	0.47	-0.27	5×10^{-4}	<i>POU3F3</i>	ALH		
5	AX-26193433	88894322	0.17	-0.57	6×10^{-4}	<i>SLCO1A2</i>	BCF		
5	AX-26193433	88894322	0.17	-0.57	6×10^{-4}	<i>IAPP</i>	BCF		
5	AX-26193433	88894322	0.17	-0.57	6×10^{-4}	<i>SLCO1B3</i>	BCF		
10	AX-18783898	42984748	0.10	-0.85	2×10^{-4}	<i>VCPKMT</i>	BCF	Expresado en testículos	(Fusser y col., 2015; Sosa-Madrid y col., 2020)
10	AX-18783898	42984748	0.10	-0.85	2×10^{-4}	<i>SOS2</i>	BCF		
11	AX-19288514	62795727	0.10	0.80	1×10^{-4}	<i>LGALSL</i>	BCF		

Nota: **Cr**: Cromosoma; **SNP**: Polimorfismo de Nucleótido Simple; **Posición**: posición en pares de bases del marcador en el cromosoma; **MAF**: frecuencia del alelo menor; **B**: efecto de la variante del marcador en el carácter estudiado; **p ajustado**: p luego de la corrección con el método SGoF; **VCL**: velocidad curvilínea; **VSL**: velocidad en línea recta; **VAP**: velocidad media de la trayectoria; **ALH**: amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza y **BCF**: frecuencia de cruce de la cabeza con respecto a su trayectoria promedio.

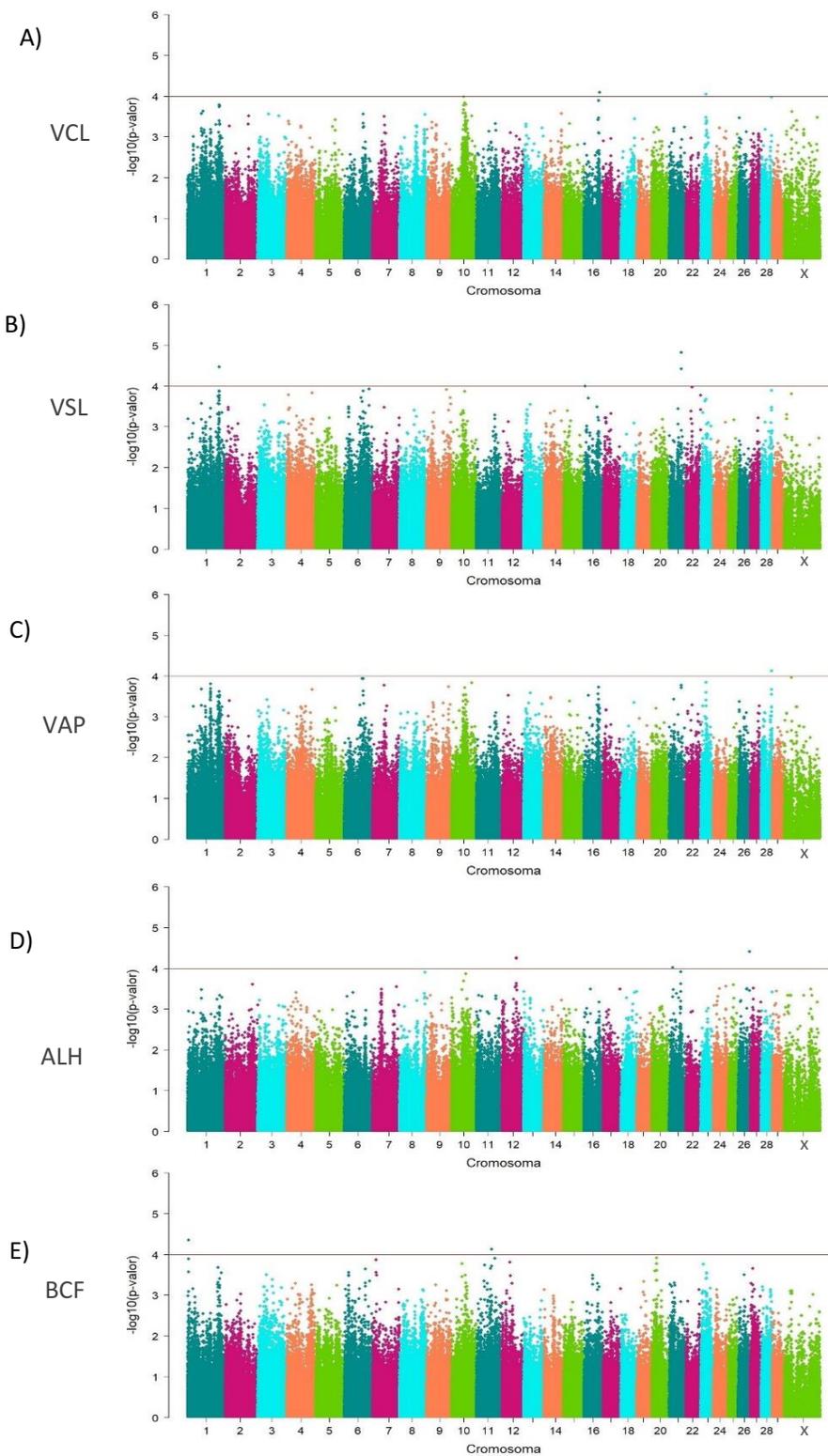


Figura 1. Diagrama de Manhattan por variable. La línea está ajustada a $10E-4$. 1A: Gráfico de Manhattan de la variable VCL; 1B: gráfico de Manhattan de la variable VSL; 1B: gráfico de Manhattan de la variable VAP; 1D: gráfico de Manhattan de la variable ALH; 1E: gráfico de Manhattan de la variable BCF

Además, se encontró que el producto de este gen podría intervenir en el mecanismo del criodañó y disminución de la motilidad espermática, ya que fue diferencialmente expresada en muestras de semen crio-preservadas (Wang y col., 2021).

Por último, el gen *PRIM1*, codifica para una protamina nuclear que se expresa específicamente en células germinales masculinas y ha sido señalado como indicador de daño criogénico del ADN de espermatozoides (Valcarce y col., 2013) y su expresión fue positivamente correlacionado con la fertilidad en un estudio que involucró varias razas bovinas (Pardede y col., 2022).

Discusión

Si bien estudios previos de tipo GWAS han resultado en la identificación de varios genes candidatos asociados a la calidad espermática (Diniz y col., 2014; Gottschalk y col., 2016; Fortes y col., 2020), el presente estudio aborda por primera vez la asociación entre regiones genómicas y la longevidad espermática post descongelado en el bovino, un carácter poco estudiado en términos moleculares.

Recientemente, Sweett y col. (2020) reportaron genes candidatos asociados a circunferencia escrotal y motilidad espermática, algunos de los cuales habían sido previamente asociados a fertilidad. De igual manera, Puglisi y col. (2016), realizaron un GWAS de rasgos espermáticos y de fertilidad en toros identificando regiones genómicas asociadas con VAP, motilidad progresiva e integridad de membrana en toros Holstein. A diferencia de tal estudio, en este capítulo se analizaron cinco parámetros cinemáticos obtenidos a partir de CASA, y se identificaron regiones genómicas asociadas a todos ellos. Además, se tuvo en cuenta la variación

en el tiempo de las variables analizadas, constituyendo así el primer análisis genómico de este fenotipo espermático.

Los ensayos de longevidad espermática otorgan información no solo de la crio-supervivencia sino también de la dinámica de motilidad a través del tiempo; particularmente en muestras que han sido congeladas. Esto es importante ya que se sabe que las mismas poseen una reducida motilidad, comparada con muestras de semen fresco (Nijs y Ombelet, 2001; Ahmad y col., 2015), pudiendo también producir una reducción en la longevidad espermática. Si bien en la actualidad se implementan metodologías para intentar mitigar el efecto de la congelación, éstas están especialmente enfocadas en mejorar el ambiente externo del espermatozoide, como los diluyentes y diferentes protocolos de crio-preservación (Mocé y col., 2010; Nagata y col., 2019). Por el contrario, solo unos pocos estudios han señalado el componente genético como un factor que pueda mejorar la crio-supervivencia espermática. En este sentido, Hering y col. (2014) encontraron una influencia en variantes del gen *ARSD* sobre la cinemática espermática en toros, encontrándose diferencias en el promedio post descongelado de VCL y VSL asociadas a variantes alélicas específicas. De manera similar, Gmel y col. (2021) identificaron en un QTL (*Quantitative Trait Loci*) un gen candidato en equinos, cuyas variantes alélicas también se asociaron con diferencias en la motilidad progresiva luego del descongelado. En este capítulo también se identificaron varios SNPs asociados a la variación cinemática individual en el tiempo. Varios de ellos se encontraron en desequilibrio de ligamiento con regiones genómicas que contienen genes específicos, algunos de los cuales estuvieron previamente relacionados con procesos de crio-supervivencia. Estos hallazgos podrían contribuir a mejorar la comprensión de los mecanismos genéticos involucrados en la crio-supervivencia y posterior longevidad espermática. Teniendo en cuenta que la industria ganadera emplea principalmente muestras de semen congelado para inseminación artificial, identificar marcadores moleculares para esos fenotipos, significaría una

ventaja en la evaluación de calidad espermática. El trabajo desarrollado en este capítulo intenta establecer las bases para analizar caracteres complejos como la longevidad espermática, teniendo en cuenta el efecto genético individual de cada animal.

Genes candidatos

En este capítulo se identificaron varias regiones génicas que podrían explicar la supervivencia y longevidad espermática debido a su potencial rol en las vías relacionadas con este proceso. Por ejemplo, el gen *ITPR2*, que codifica para el receptor de inositol 1,4,5-trifosfato (uno de los principales canales intracelulares de Ca^{2+}), se asoció significativamente con VAP y VCL en BTA5. Este receptor ha sido previamente relacionado con el inicio de la reacción acrosómica (Minelli y col., 2000) y con el inicio y mantenimiento de la motilidad hiperactivada (Ho y Suarez, 2001) en mamíferos. Asimismo, ha sido demostrado que *PLD1* se expresa principalmente en la región acrosomal de la cabeza del espermatozoide bovino, sugiriendo un posible rol en la reacción acrosómica (Garbi y col., 2000), aunque también fue asociado con formación de F-actina en los espermatozoides durante el proceso de adquisición de la hipermotilidad (Cohen y col., 2004). Siendo que ambos genes han sido significativamente asociados a variaciones en los fenotipos de velocidad espermática, podemos concluir que concuerdan con la teoría propuesta por Dorado y col. (2015), en la cual se sugiere que la longevidad de los espermatozoides en muestras crio-preservedas podría estar afectada parcialmente por un temprano establecimiento de los procesos relacionados con la capacitación espermática e hipermotilidad, pudiendo afectar negativamente la fertilidad de dichos animales a campo.

Adicionalmente, varios genes relacionados previamente con la fertilidad en diversas especies también fueron significativamente asociados a variaciones en la cinemática post descongelado en bovinos Retintos en este capítulo. Entre ellos, el gen *VCPKMT*, previamente

asociado con la implantación del embrión en conejos (Sosa-Madrid y col., 2020); el gen *EPHB1*, sobrexpresado en los testículos de los ratones en asociación con la migración celular y la comunicación durante la espermatogénesis (Guo y col., 2004); el gen *HSD17B6*, asociado con la tasa de clivaje en embriones bovinos mediante la regulación de las concentraciones de esteroides sexuales en el ovario y el testículo (Cochran y col., 2013) ; y *PTGES3*, que codifica para una prostaglandina sintetasa expresada principalmente en el endometrio uterino (Seo y col., 2014). A su vez, la proteína PTGES3, cuya expresión es regulada por *GSK3A*, se encontró diferencialmente expresada en muestras de semen descongeladas, lo que podría indicar su papel en el proceso de daño criogénico (Wang y col., 2021).

Curiosamente, variaciones en el gen *RORA* fueron recientemente asociadas significativamente con la variable VCL en el espermatozoide bovino (Borowska y col., 2018). *RORA* es un miembro de la superfamilia de receptores huérfanos nucleares, que está sobreexpresado en espermátidas redondas en hombres con azoospermia obstructiva (Yao y col., 2017). Sayed y col. (2019) informaron que los ratones deficientes en *RORA* mostraron cambios patológicos en la morfología testicular. Del mismo modo, Sayed y col. (2020) indicaron que la falta de *RORA* provocaba un daño testicular que aumentaba con la edad afectando el normal desenvolvimiento de la espermatogénesis. Siendo que la variación de la calidad espermática es un carácter eminentemente cuantitativo y poligénico, los resultados de este capítulo sugieren que uno de los mecanismos involucrados en el control genético de la espermatogénesis puede estar asociado a variaciones en el gen *RORA*.

Finalmente, es sabido que ciertos ARNm paternos son críticos para el normal desarrollo embrionario temprano. En este estudio, se detectó una asociación entre VSL y el gen *PRM1*, cuyo principal sitio de expresión es la célula espermática. Si bien *PRM1* ha sido previamente relacionado con la fertilidad en humanos, afectando la motilidad espermática (Lambard y col., 2004; Oliva,

2006), es interesante resaltar que su expresión fue menor en muestras de semen descongelado, en comparación con semen fresco (Valcarce y col., 2013), indicando que variaciones en este gen podrían tener un papel importante en la disminución de la motilidad en semen descongelado, ya que estuvo asociado con la variable de velocidad VSL. Por otro lado, Gosálvez y col. (2011) demostraron que *PRM1* está asociado con la estabilidad del ADN de las células espermáticas en un estudio que incluyó eyaculados de 11 especies mamíferas distintas, incluido el toro. Un reciente estudio demostró que toros con elevada fertilidad presentaban una mayor expresión de este gen, por lo cual propusieron su utilización como marcador de fertilidad (Pardede y col., 2022). Por tal motivo, se propone que la existencia de variaciones en el gen *PRM1* entre individuos podría producir diferencias en la crio-resistencia de los espermatozoides afectando así la longevidad espermática, post descongelado.

Conclusión

Este estudio exploratorio identificó la existencia de un componente genético asociado a la longevidad espermática post-descongelado en el bovino. Adicionalmente, se pudieron detectar regiones genómicas que podrían tener un efecto en el control de dicha variación, en las cuales se localizan genes previamente relacionados con la espermatogénesis y capacitación temprana. Sin embargo, es importante destacar que estos resultados deben tomarse con cautela, debido al reducido número de muestras analizadas. Por tal motivo, aún son necesarias investigaciones de mayor escala, tanto en número de animales como en variabilidad racial para intentar dilucidar los mecanismos que subyacen a la variación de en la longevidad espermática post-descongelado en el ganado vacuno.

DISCUSIÓN GENERAL

Endogamia

El estudio de la endogamia en el bovino ha cobrado relevancia debido a sus efectos perjudiciales en caracteres relacionados con la supervivencia, producción y/o reproducción. Si bien los efectos de la endogamia han sido estudiados previamente, los resultados son un poco discordantes. Esto puede deberse a varios motivos, entre los cuales se pueden mencionar: el origen de los datos, (pedigrí o genómicos) o a la carencia de individuos con elevado nivel de endogamia. A su vez, los datos obtenidos de pedigrí pueden variar en función del número de generaciones conocidas (Cassell y col., 2003), mientras que, para datos moleculares, la estimación del coeficiente depende de la densidad de marcadores y de los parámetros establecidos para su cálculo (Ferenčaković y col., 2013). En esta tesis se ha logrado cubrir varias de esas limitantes. En primer lugar, se estudió una población (Retinta) que contaba con datos de pedigrí con un promedio de seis generaciones equivalentes conocidas, lo cual es considerablemente razonable para este tipo de estudios. Asimismo, dicha población contaba con varios individuos con niveles de consanguinidad contrastantes, desde cero hasta valores de 0,30 (Figura 1A). Por otra parte, en cuanto a las limitaciones derivadas de la densidad de marcadores moleculares, en el capítulo 1, 2 y 4 se trabajó con *SNP-array* de alta densidad, mientras que en el capítulo 3, se usaron genotipos obtenidos a partir de *SNP-array* de mediana densidad, y, al evaluar la correlación entre los coeficientes F_{ROH} obtenidos a partir de ambos, se encontró una correlación alta ($r=0,97$, datos no mostrados), confirmando la hipótesis de Ferenčaković y col. (2013), quienes plantearon que un ajuste adecuado de los parámetros para la obtención de ROH, según la densidad del *array*, puede minimizar los potenciales errores derivados del uso de cada uno de ellos.

Evaluación molecular de la endogamia

El uso de datos genómicos junto con el desarrollo de modelos estadísticos sofisticados ha mejorado la precisión y fiabilidad en el estudio de la endogamia. En esta tesis se utilizaron marcadores de tipo SNP para determinar el nivel de endogamia individual. En primera instancia, se utilizó un método básico implementado en el *software cgaTOH* (Zhang y col., 2013) para la identificación de TOH (*Tracts of Homozygosity*) mediante la evaluación de SNPs en homocigosis y una serie de parámetros, como número mínimo de SNP's, número de genotipos heterocigotos y nullos permitidos. Posteriormente se utilizó la librería *detectRUNS* (Marras y col., 2015) implementada en R, empleando el algoritmo "*consecutive.runs*", para detectar ROH (*Runs of Homozygosity*), utilizando también varios parámetros preestablecidos, como por ejemplo número mínimo de SNP's, longitud mínima, y número de SNP heterocigotos y nullos permitidos. Por último, se empleó una metodología basada en modelos probabilísticos de Markov para determinar ROH, en este caso llamados HBD, ya que se estima de manera más precisa la presencia de segmentos homocigotos por descendencia (HBD: *Homozygous-by-Descent*). Este modelo se basa en asumir que el genoma de un individuo presenta dos posibles estados: HBD y no-HBD, de esta manera discrimina segmentos idénticos por descendencia de aquellos que son idénticos por estado; además, tiene en cuenta, para dicho cálculo, el desequilibrio de ligamiento, la frecuencia alélica en la población y la tasa de error de genotipado. Este método ha demostrado ser el más fiable, debido a que, al utilizar un método probabilístico, se encuentra menos sesgado por el establecimiento a priori de parámetros. Sin embargo, en esta tesis se demostró que los coeficientes obtenidos utilizando *detectRUNS* se correlacionaban con aquellos obtenidos con *RzooRoH* ($r=0,96$). Con lo cual se puede concluir que los parámetros usados en esta tesis para aplicar la metodología implementada en *detectRUNS* son fiables para la determinación de segmentos homocigotas idénticos por descendencia.

A lo largo de esta tesis no solo se han implementado y comparado diferentes métodos de cálculo de la endogamia, sino también, se han demostrado las ventajas y desventajas de cada uno de ellos, y se determinaron las correlaciones correspondientes con F_{PED} para validar estos resultados. Por ejemplo, en el capítulo 1 se demostró una correlación media-alta de 0,6 entre F_{PED6} y $F_{ROH>8Mb}$ (correspondiente a fragmentos producidos en las últimas seis generaciones). Un valor similar de correlación fue hallado en otros trabajos con un número promedio de generaciones conocidas de cinco, en Holstein ($r=0,65$) (Marras y col., 2015), ganado pardo suizo, ($r=0,60$) (Ferenčaković y col., 2013), y Simmental (0,68) (Ferencakovic, 2011). Estos trabajos señalan, además, la utilidad del estimador F_{ROH} para detectar endogamia reciente. Sin embargo, la correlación obtenida en esta tesis fue mayor cuando se tuvo en cuenta el F_{ROH} global ($r=0,79$), siendo los valores promedio de F_{PED} mayores que F_{ROH} . Esta diferencia puede deberse a factores como: 1) la persistencia de ROH ancestrales a través del tiempo debido a las bajas tasas de recombinación, que se ignoran en la estimación de F_{PED} , y, 2) el error estocástico de la herencia de fragmentos idénticos por descendencia (Curik y col., 2014). Por ejemplo, en el capítulo 1 animales con F_{PED} bajo, hipotéticamente carentes de eventos de endogamia recientes, presentaron fragmentos ROH de más de 20 Mb que corresponderían a eventos endogámicos ocurridos en las últimas tres generaciones (ver individuos 11, 12, 13 y 14 en Figuras 1A y 1B del capítulo 1).

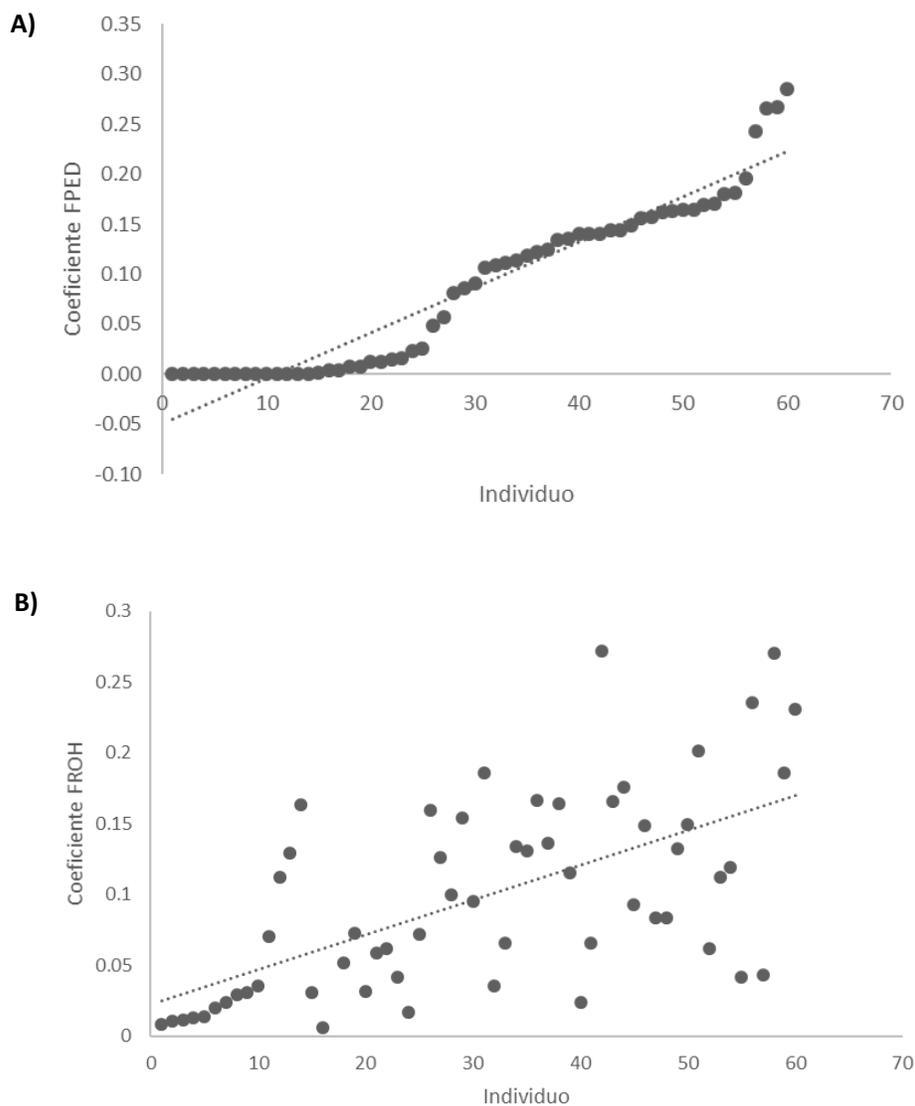


Figura 1. Distribución de los coeficientes de consanguinidad F , obtenidos a partir de pedigrí, F_{PED} (A) y a partir de ROH, F_{ROH} (B)

Distribución de ROH

La distribución y abundancia de ROH puede variar por raza, debido a la historia demográfica y/o proceso de selección que haya experimentado cada una de ellas (Purfield y col., 2012; Szmatoła y col., 2016; Toro-Ospina y col., 2022). Así, se demostró que existen regiones más

propensas a acumular ROH, denominadas ROHi, que se producen principalmente por eventos de selección en loci de caracteres cuantitativos (QTL) (Szmatoła y col., 2016) con alto desequilibrio de ligamiento o bien en regiones con bajas tasas de recombinación (Gibson y col., 2006; Bosse y col., 2012; Peripolli y col., 2018). Por otro lado, Curtis y col. (2008) plantearon que la acumulación de ROH en ciertas regiones podría deberse a pequeñas inversiones que suprimen la recombinación. En el capítulo 1 se determinó que la acumulación de ROH encontrados no estuvo correlacionada con la tasa de recombinación, con lo cual se descartó su posible origen por selección. Esta acumulación podría explicar la depresión endogámica, ya que se pudieron identificar regiones enriquecidas en ROH (totales y > 8Mb) en individuos Retintos endogámicos ($F_{PED} > 0,125$), donde se encontraron genes asociados a la preñez (proteínas PAG), al sistema inmunológico (*defensina B*), microtúbulos y ensamblaje del flagelo. En paralelo, también se pudo evidenciar que varios individuos con el mismo nivel de consanguinidad ($F_{PED3}=0,125$), presentaban una distribución desigual de ROH, remarcando la importancia de estudiar la localización de las regiones en homocigosis sobre el valor genómico total de F. Esta variabilidad entre individuos fue hallada en estudios previos y se propuso que una de las razones que podrían explicarla sería la diferencia en las generaciones en las que se produjeron (Mészáros y col., 2015), ya que la longitud de los fragmentos puede variar según la generación en la cual se formaron (Fisher, 1954). Siguiendo este supuesto, eventos de endogamia producidos en diferentes generaciones en distintos individuos generarían los fragmentos de diferente longitud y más aún, si en la misma línea genealógica de un individuo se produjeron varios eventos endogámicos, éste es más propenso a acumular una mayor cantidad de ROH y que además sean de diferente longitud.

En el capítulo 3, se evidenció que la abundancia de fragmentos HBD a nivel cromosómico podía variar entre razas. En particular, se observaron diferencias significativas en los promedios de F_{HBD} entre las razas en 10 cromosomas, siendo mayor en la raza Holstein para algunos de ellos.

Sin embargo, al estudiar las regiones enriquecidas en HBD, solo se detectó su presencia en dos de las tres razas estudiadas; en Retinta, las regiones se encontraron en BTA14, mientras que, en Angus, en BTA16. En ambos casos se encontraron genes relacionados a QTL's de peso y crecimiento en Retinta, y QTL's asociados al peso corporal, peso de la canal y área de ojo de bife en Angus. De esta manera se pudieron detectar regiones en homocigosis que afectaban exclusivamente a las razas, hipotéticamente formadas como consecuencia de la selección artificial y que no serían perjudiciales. La falta de ROHi en Holstein, a pesar haber presentado una abundancia significativamente mayor de fragmentos HBD en varios cromosomas, indica nuevamente que el valor absoluto de HBD resulta poco informativo, incluso a nivel cromosómico, precisando el estudio de las regiones específicas que presentan y acumulan significativamente fragmentos homocigotos. Adicionalmente, se detectaron ROHi en la población general que no estuvieron asociadas específicamente a las razas encontrándose regiones codificantes asociadas a ellos relacionadas con procesos catalíticos y actividad endo-peptidasa. Aunque estos grupos no estuvieron relacionados con la calidad espermática, sí se encontraron genes relacionados a motilidad espermática y fertilidad al considerar ROHi provenientes de fragmentos considerados recientes (>8 Mb), producidos en las últimas seis generaciones.

Los resultados de esta tesis concuerdan con lo planteado en la bibliografía sobre la distribución desigual de los fragmentos ROH a lo largo del genoma y entre individuos. Por otro lado, a pesar de las diferencias de F_{HBD} a nivel cromosómico, el análisis de las regiones enriquecidas en HBD por raza y a nivel poblacional aportó resultados más concluyentes e informativos. Adicionalmente, el estudio de regiones enriquecidas provenientes de HBD generados recientemente (últimas seis generaciones) permitió detectar genes previamente reportados asociados a motilidad espermática y fertilidad que podrían explicar parcialmente la depresión endogámica observada en las subpoblaciones espermáticas.

Potencial aplicación en Argentina

Una característica común en las tres razas estudiadas es la incorporación de datos genómicos (en forma de genotipos SNP-array) en sus programas de mejora, tanto en pruebas de parentesco, como para su programa de selección. Por tal motivo, este tipo de información está actualmente disponible en Argentina (en manos de sus criadores), por lo que, en adecuadas circunstancias, podría utilizarse para profundizar el estudio de endogamia molecular.

A modo de ejemplo, la Asociación de Criadores de Holando Argentino (ACHA) incorporó pruebas genómicas para evaluar la raza en el año 2013, mediante la utilización de paneles de 6.909 (6K) y 50.000 (50K) marcadores SNP, que permiten evaluar en la actualidad más de 40 caracteres de producción, tipo y conformación y un índice compuesto de producción y morfología. De este modo, la incorporación de estimadores de consanguinidad obtenidos a partir de datos moleculares resulta no solo factible, sino que además puede ser utilizada para la planificación de los cruzamientos con el objetivo de mitigar el aumento de la tasa de consanguinidad, pero también incorporando conceptos como endogamia reciente y ancestral. Si bien el nivel de consanguinidad promedio F_{PED} estimado en la población de Holando Argentino para los años entre 1990 y 2009 fue bajo, de 3,38%, su crecimiento presentó una marcada tendencia positiva (Andere y col., 2017). Sin embargo, dicho valor podría estar siendo subestimado debido a que el coeficiente F_{PED} tradicional no tiene en cuenta el error de muestreo mendeliano ni el desequilibrio de ligamiento, como fue demostrado en una población argentina de Brangus (Forneris y col., 2021). Nuestros resultados, utilizando datos genómicos, han demostrado valores significativamente más altos.

En cuanto a la raza Aberdeen Angus, es una de las principales razas bovinas carniceras criadas en Argentina, contando con más de 500.000 reproductores registrados. En 1989 la

Asociación Argentina de Angus, junto con el INTA incorporaron el programa E.R.A. (Evaluación de Reproductores Angus). A partir del año 2019 se dio un paso adicional, comenzando a realizar evaluaciones genómicas para obtener DEP enriquecidos de caracteres de producción. En la actualidad se cuenta con una población de referencia nacional de más de 2.000 reproductores Angus y más de 9.000 animales genotipados en *SNP-array* de 75.000 (75k) (https://www.angus.org.ar/archivos_era.php). Al igual que en la raza Holstein, la creciente genotipificación de animales de élite haría factible la utilización de información genómica para estimar coeficientes de endogamia molecular, tales como los F_{ROH} , y, además, permitiría mejorar la planificación los cruzamientos entre los mejores reproductores, evitando la posible depresión endogámica que puede afectar principalmente la fertilidad de los animales.

La calidad espermática como medida de fertilidad

Los espermatozoides son células altamente especializadas que presentan una gran variabilidad. La heterogeneidad de la forma espermática ha sido planteada como una ventaja evolutiva, siendo asociada también con patrones de motilidad diferentes (Gomendio y Roldan, 2008). Algunos de ellos han sido también asociados a mejoras en la fertilidad. En estudios previos se ha planteado que espermatozoides con cabezas alargadas tendrían mayor capacidad hidrodinámica de movimiento y, por ende, mayor potencial de fertilización (Malo y col., 2006). Sin embargo, al día de hoy no existe un estudio concluyente acerca de esta relación y los resultados de los diferentes trabajos realizados a la fecha son poco consistentes (Simmons y Fitzpatrick, 2012). Esto puede deberse, en parte, a la elevada variabilidad individual (Fitzpatrick y col., 2010), como fue demostrado en el capítulo 2, donde cerca del 70% de la variabilidad observada fue explicada por el individuo. Por tal motivo, el análisis de la morfometría espermática realizado en esta tesis se basó en estudios de subpoblaciones, donde la variabilidad de cada individuo fue

resumida mediante las proporciones de cada subpoblación. Así, se pudo demostrar un efecto de la endogamia en la forma de la cabeza, aunque no se encontró relación con patrones de motilidad (datos no mostrados). Esto podría deberse a que no se tuvieron en cuenta los demás componentes del espermatozoide que intervienen en la motilidad, como el rol del flagelo y de la pieza media que contiene las mitocondrias, ni la relación longitudinal entre dichos componentes, los cuales serían necesarios para obtener resultados más precisos cuando se busca establecer una relación entre motilidad y morfología (Malo y col., 2006). No obstante, la importancia de la forma de la cabeza del espermatozoide no debería ser desestimada ya que su relación con la integridad de la cromatina y la fertilidad ha sido demostrada (Sailer y col., 1996; Enciso y col., 2011).

A pesar de que en la actualidad no existe una prueba, (ni tampoco un conjunto de pruebas) que puedan determinar fielmente el potencial fertilizante de una muestra, se han logrado avances en la identificación de marcadores asociados a características seminales que podrían estar influenciando en mayor o menor medida el éxito en la fertilización (Fonseca y col., 2018; Fortes y col., 2020). Dichos marcadores podrían ser incorporados en los programas de selección genómica, aumentando la precisión en la elección de reproductores con alta fertilidad. El aporte desde esta tesis ha sido la identificación de genes involucrados tanto en la morfometría como en los patrones de motilidad espermática (análisis cinemático). La morfometría espermática ha sido poco estudiada en la especie bovina, siendo esta tesis, uno de los primeros trabajos realizados aportando resultados significativos, ya que se demostró que su variación es afectada por la endogamia, lo cual podría explicar parcialmente la aparición de la depresión endogámica en la fertilidad, la cual es bien conocida. Además, los resultados de esta tesis pueden servir como base para buscar una asociación directa entre morfometría y fertilidad, tal cual lo han sugerido recientemente (Rubessa y col., 2020). Por otro lado, también se propuso un nuevo modelo para estudiar la variación en el tiempo de caracteres relacionados con la velocidad y trayectoria del

movimiento espermático, obteniendo pseudo-fenotipos que representen la variabilidad individual de cada animal. La obtención de este tipo de fenotipo, derivado de varios datos, permite estudiar de manera más simplificada algún carácter en particular, siendo un enfoque innovador e interesante para futuras investigaciones.

Depresión endogámica

En trabajos anteriores se ha estudiado el efecto de la depresión endogámica en la calidad espermática, evaluando caracteres como motilidad masal, progresiva, morfología, número total de espermatozoides y porcentaje de espermatozoides vivos (Ferenčaković y col., 2017; Santymire y col., 2019; Antonios y col., 2021). En todos ellos, se han realizado evaluaciones objetivas y se han utilizado modelos de regresión lineal. Sin embargo, la linealidad de la depresión endogámica es discutida, incluso llegando a plantear que su efecto responde a un modelo umbral (Frankham, 1995) . Esto se debe a varios factores, principalmente relacionados con la falta de variabilidad y fiabilidad de los coeficientes F , en particular aquellos obtenidos a partir de datos de pedigrí, o al reducido número de muestras con valores altos de consanguinidad, aunque también a la propia arquitectura del efecto deletéreo del aumento de la homocigosidad. En cualquier caso, los enfoques lineales y basados en datos de pedigrí pueden generar sesgos en la estimación del coeficiente de regresión.

En esta tesis se han utilizado tanto modelos de umbral, para definir grupos de alta y baja consanguinidad (Capítulos 2 y 3), como también una correlación por rangos (Capítulo 4) para evaluar la depresión endogámica en caracteres de morfometría y cinemática espermática asociada a longevidad. En el caso del análisis por umbrales, si bien se tiene conocimiento de que establecer el límite adecuado no es una tarea fácil, se consideró una endogamia de 0,125, basado

en estudios previos en bovinos que demostraron que dicho valor podría ser significativo para caracteres de producción (Sewalem y col., 2006) y de fertilidad (González-Recio y col., 2007).

En el estudio de morfometría, se pudieron distinguir diferentes patrones de subpoblaciones entre los grupos de alta y baja endogamia. Estas diferencias se evidenciaron principalmente en dos grupos de espermatozoides: pequeños y con cabezas alargadas y, grandes y anchas, siendo los primeros significativamente más abundantes en el grupo de alta consanguinidad, y los segundos en el grupo de baja consanguinidad. Si bien varios trabajos han asociado los espermatozoides de cabezas alargadas con una mayor capacidad de motilidad, hipotetizando que la forma alargada optimizaría la progresión dentro del aparato reproductor femenino (Malo y col., 2006) , en esta tesis, no se encontró correlación entre la elongación de la cabeza y una mayor progresividad (datos no mostrados). Estos resultados concuerdan con un estudio llevado a cabo en toros donde tampoco se detectó dicha relación (Gravance y col., 2009). Una de las posibles razones de dicha discordancia podría ser que, en ambos casos se realizaron comparaciones de los valores promedios de las variables, y dada la alta variabilidad intra-individual mencionada anteriormente, estos análisis no serían los más adecuados para esta clase de datos. En este sentido, esta tesis permitió evidenciar la importancia y fiabilidad del uso de análisis estadísticos de agrupamiento para identificar y caracterizar la variabilidad de una muestra espermática, en comparación con aquellos que solo determinan el valor promedio y la dispersión de cada variable, permitiendo predecir su potencial capacidad de fertilización con más precisión.

Adicionalmente, se encontraron genes candidatos diferencialmente afectados por la endogamia en el grupo de alta endogamia que se relacionaron con procesos asociados con la espermatogénesis. Estos resultados, aunque no fueron validados mediante estudios funcionales, sirven como base para estudiar su posible mecanismo de acción y su efecto en la determinación de un carácter poco estudiado como es la morfometría.

Depresión endogámica a nivel cromosómico y por longitud

La longitud de fragmentos puede influir en el efecto de la depresión endogámica, de modo que fragmentos largos, correspondientes a eventos de endogamia ocurridos más recientemente, serían más perjudiciales que aquellos más cortos producidos en generaciones más remotas (Antonios y col., 2021; Lozada-Soto y col., 2021). En esta tesis se hallaron resultados consistentes con esta teoría. Por ejemplo, en el capítulo 1, donde el estudio de regiones >8Mb (hipotéticamente generados en las últimas seis generaciones) resultó en la identificación de regiones que albergaban genes que podrían afectar la motilidad espermática como, por ejemplo, genes relacionados con microtúbulos, ensamblaje del flagelo, y la actividad de la quinasa inositol polifosfato.

En el capítulo 3 y 4 se estudió la depresión endogámica utilizando dos enfoques: a nivel cromosómico y por categoría de longitud. Una de las ventajas de la utilización de marcadores genómicos y el desarrollo de nuevas metodologías para analizar los fragmentos en homocigosis, ha sido la posibilidad de poder abordar este tipo de estudios. Aunque la depresión endogámica a nivel cromosómico ha demostrado algunas inconsistencias (Laseca y col., 2022), existen trabajos recientes que publicaron resultados interesantes, planteándose incluso la utilización de haplotipos para determinar el efecto depresión endogámica cromosómica (Martikainen y col., 2018; Pilon y col., 2021). Por otro lado, las diferencias de magnitud en el efecto negativo provocado por un aumento de la endogamia ancestral o reciente, han sido también demostradas en trabajos recientes. En este sentido, Mankanjuola y col. (2020) demostraron un efecto desfavorable de la endogamia reciente en la producción de proteínas de la leche en vacas Holstein, mientras que el aumento de la endogamia ancestral mostró efectos favorables, incrementando incluso su producción.

En el capítulo 3, se encontró un efecto de depresión endogámica a nivel cromosómico, en tres cromosomas diferentes, BTA11, BTA13, y BTA16; mientras que, a nivel de categoría de longitud, se encontró depresión endogámica en una categoría F_{HBD} 6G (endogamia reciente correspondiente a las últimas seis generaciones), afectando principalmente a las subpoblaciones de espermatozoides hiperactivos y medios progresivos. Sin embargo, los resultados a nivel cromosómico fueron opuestos a los encontrados en la categoría de endogamia reciente. Una de las posibles razones que explicaría esta discordancia es que para el análisis por cromosoma se tuvieron en cuenta tanto los fragmentos cortos como los largos (ancestrales y recientes), y como plantearon Howard y col. (2017), los fragmentos cortos pueden generar sesgos en el análisis de depresión endogámica debido a que, por efecto de la purga genética, los alelos desfavorables son eliminados de la población, sugiriendo que estos fragmentos cortos que permanecen en la población no deberían ser contabilizados en el análisis de depresión endogámica, ya que no producirían un efecto deletéreo. Por otro lado, al estudiarse las regiones enriquecidas en HBD, solo BTA11 coincidió con lo encontrado en el análisis de depresión endogámica. Sin embargo, las regiones afectadas contenían solo un gen, el cual no estaba relacionado con el movimiento espermático. Por su parte, al estudiarse las regiones enriquecidas en HBD correspondientes a las últimas seis generaciones, se encontraron varios genes, dos de los cuales, *PRDM14* y *NPHP4*, fueron previamente asociados con la fertilidad y la motilidad espermática, permitiendo explicar, al menos parcialmente, la componente genética de la depresión endogámica en las subpoblaciones espermáticas en bovinos.

Adicionalmente, la inclusión de tres razas en nuestro análisis permitió diferenciar las regiones en homocigosis propias de cada raza de aquellas debidas a la depresión endogámica. En este sentido, a pesar de contar con una población pequeña y que algunas razas estuvieron menos representadas que otras, se pudo evidenciar un efecto racial, tanto a nivel fenotípico como

genómico, lo que sirvió como base para explicar el efecto de la depresión endogámica en la cinemática espermática.

En el capítulo 4 se analizó la correlación entre el coeficiente de endogamia y los pseudo-fenotipos de cinemática espermática mediante un test de correlación de Spearman, que mide la relación por rangos de ambas variables. En este capítulo sólo se analizaron las muestras de la raza Retinta, así que no fue necesario tener en cuenta el efecto raza. Si bien se analizaron las variables cinemáticas por separado, los resultados, fueron coincidentes con lo hallado en el capítulo 3, ya que las variables afectadas, VCL, ALH y BCF fueron positivamente correlacionadas, en diferentes grados, con el nivel de consanguinidad siete cromosomas diferentes, indicando que un aumento en el nivel de endogamia provocaría un aumento del conjunto de dichas variables, que caracterizan a un patrón hiperactivo. Por otro lado, se encontró efecto de depresión endogámica en la variable BCF y todas las categorías con excepción de la categoría 1-2Mb, correspondiente a eventos de endogamia producidos hace aproximadamente 50 generaciones atrás. Si bien las correlaciones fueron moderadas en las demás categorías, la categoría que presentó mayor correlación (0,37) fue la de 8-16 Mb, correspondiente a eventos endogámicos producidos entre tres y seis generaciones atrás. Esta generación, considerada como reciente, ha demostrado ser más perjudicial que la endogamia ancestral, como fue demostrado en varios capítulos de esta tesis.

Efecto de la endogamia en la hiperactivación temprana

Tanto en el capítulo 3 como en el 4, la depresión endogámica afectó el patrón de hiperactivación espermática. Este patrón de movimiento es caracterizado por un batido flagelar ancho y rápido pero errático, no progresivo. Yanagimachi (1970) fue el primero en reconocer este patrón y propuso que dicho movimiento facilitaba la entrada del espermatozoide al ovocito, a

través de la zona pelúcida. Con los años, fue reconocido como parte del proceso de capacitación espermática, aunque con una vía de señalización de inicio diferente, activándose en un tiempo y espacio determinado (en el oviducto y cercano al ovocito (Suarez y col., 1991; Demott y Suarez, 1992)). Sin embargo, debido a los requerimientos energéticos de la hiperactivación (Sansegundo y col., 2022), se ha planteado que su duración debería ser óptima y precisa, evitando desgastes innecesarios.

Es importante destacar que el proceso de hiperactivación fue mencionado varias veces a lo largo de esta tesis. En primer lugar, en el análisis funcional del capítulo 1 se encontraron genes asociados con el ensamblaje flagelar, que explicaron el patrón de hiperactivación evidenciado en un estudio anterior con los mismos animales y que provocó una disminución en la fertilidad (Dorado y col., 2015). Por otro lado, más adelante, en los capítulos 3 y 4, de subpoblaciones y variación cinemática en el tiempo, se volvió a presentar este patrón hiperactivado, donde fue mencionado como una consecuencia del proceso de crío-preservación y que, a su vez, estaría afectado por la depresión endogámica, con lo cual los genes de las vías que inducen y/o mantienen este tipo de movimiento se verían más afectados al encontrarse en homocigosis. Si bien esta teoría no está validada, en un estudio anterior se encontró un haplotipo que abarcaba genes que afectaban la función espermática en la fertilización, estaba asociado con una hiperactivación temprana en una cepa de ratones (Olds-Clarke, 1989), evidenciando un componente genético que podría afectar las vías de señalización del inicio de la hiperactivación. Nuestro trabajo ha encontrado bases para profundizar esta teoría, incluso empleando diversas aproximaciones metodológicas. Sin embargo, quedan pendientes estudios poblacionales de mayor amplitud para su validación.

Evaluación genómica de los mecanismos asociados al movimiento espermático en el tiempo

Por último, en el capítulo 5 se evaluaron las regiones genómicas que podrían afectar la cinemática espermática. Como se mencionó con anterioridad, los ensayos de longevidad mediante CASA permiten evaluar no solo la resistencia a la crio-preservación, sino también la evolución cinemática a lo largo del tiempo, lo cual se ha asociado a su potencial de fertilización. Mediante el desarrollo de un modelo estadístico se pudo obtener un pseudo-fenotipo que explique la variación cinemática en el tiempo, para luego realizar un estudio de asociación genómica. En un estudio previo, se identificaron cambios en la expresión de ciertas proteínas, principalmente por fosforilación, asociados al proceso de crio-preservación y que afectaban la motilidad espermática (Wang y col., 2021). En este capítulo, se obtuvieron resultados que involucraron genes asociados con la capacitación espermática, como la reacción acrosómica y la hiperactivación, sugiriendo que la longevidad podría verse condicionada por el inicio temprano de la hiperactivación, cuyo origen se debe tanto a la crio-preservación como a la consanguinidad. Estos hallazgos son consistentes con lo que se viene planteando desde un principio en esta tesis, referente al establecimiento temprano de un patrón de motilidad hiperactivado y sus potenciales consecuencias en la fertilización. Entre los genes encontrados, uno de los más relevantes fue el gen *ITP2* que codifica para el receptor de inositol 1,4,5-trifosfato (uno de los principales canales intracelulares de Ca^{2+}), y se asoció significativamente con las variables de velocidad VAP y VCL en BTA5. Este receptor fue asociado con el inicio de la reacción acrosómica (Minelli y col., 2000) y con el inicio y mantenimiento de la motilidad hiperactivada (Ho y Suarez, 2001) en mamíferos. Otro de los genes relevantes fue *PTGES3* que codifica para una prostaglandina sintetasa que se expresa principalmente en el endometrio uterino (Seo y col., 2014). Además, al estudiar la

expresión del gen *PTGES3* en muestras de semen congelado-descongelado, se observó una disminución de la misma, mediada por la proteína *GSK3A*, que se activa durante el proceso de crio-preservación de esperma (Wang y col., 2021). A su vez, en el capítulo 1, uno de los principales genes afectados por la acumulación de ROH fue el de las prostaglandinas. Estos trabajos apoyan la hipótesis de que la expresión de las variables cinemáticas estaría afectada por la acumulación de regiones genómicas en homocigosis relacionadas a la crio-preservación, con potencial efecto en la fertilidad de la hembra. Por otro lado, el gen *RORA*, que fue asociado con la variable VCL, se encontró significativamente asociado con la misma variable en otro estudio previo llevado a cabo en bovinos (Borowska y col., 2018). Se ha encontrado que su expresión aumentada en espermátidas redondas en hombres con azoospermia obstructiva en comparación con la azoospermia no obstructiva (Yao y col., 2017). Considerando este estudio, se puede plantear que existe una relación entre la forma y la función espermática y que este gen sería uno de los involucrados en tal relación. Finalmente, los demás genes se relacionaron con procesos de implantación y clivaje de embriones.

Esta tesis ha contribuido en la investigación de estimadores de endogamia individual basados en datos moleculares, así como su utilidad para estudiar la depresión endogámica, en caracteres reproductivos importantes en el bovino, como lo es la calidad espermática. Además, se pudo comprobar la fiabilidad del coeficiente molecular, comparándolo con el coeficiente de endogamia obtenido a partir de pedigrí. Paralelamente, se lograron identificar regiones genómicas importantes significativamente afectadas por la endogamia que ayudan a explicar la depresión endogámica en caracteres como la motilidad y morfometría espermática. Por otro lado, se logró identificar un patrón de motilidad hiperactivado que estuvo afectado por el aumento de la endogamia, y que coincide con estudios previos llevados a cabo por el mismo grupo de trabajo.

CONCLUSIONES

- El coeficiente F_{ROH} obtenido a partir de ROH es un método molecular altamente fiable para determinar el nivel de consanguinidad y es más preciso que F_{PED}
- El nivel de consanguinidad molecular global resulta moderadamente informativo para estimar su posible efecto fenotípico negativo (depresión consanguínea) debido a que tanto la abundancia como la distribución de ROH no presentan un patrón constante, sino que existe una amplia variabilidad entre individuos y por cromosoma.
- El estudio de ROH *island* originadas en ROH > 8Mb) en individuos consanguíneos ($F_{ROH} > 0,125$) permitió encontrar genes asociados a los microtúbulos, el flagelo y la espermatogénesis, sugiriendo que la consanguinidad reciente puede afectar la calidad espermática en el bovino. Sin embargo, estos genes necesitan ser validados en un mayor número de muestras.
- El estudio de ROH *island* en una población compuesta por tres razas, una autóctona, otra de propósito lechero y otra de propósito de carne permitió diferenciar regiones homocigotas asociadas a la raza, de aquellas relacionadas con la depresión endogámica.
- La utilización del sistema CASA es una opción confiable para evaluar la calidad espermática, permitiendo además estudiar caracteres poco evaluados en los centros de inseminación como la morfometría y la variación de los patrones de cinética espermática en el tiempo. Sin embargo, debido a la gran cantidad y calidad de datos producidos requiere el uso de métodos multivariados para su análisis para capturar la variabilidad existente entre los diferentes espermatozoides de un mismo individuo, tanto en términos de motilidad como de morfometría.
- La morfometría espermática en el bovino es afectada por la consanguinidad, que provoca un aumento en la proporción de espermatozoides de cabeza alargada. La detección de

dicho efecto depende del tipo de método estadístico empleado, evidenciándose que el análisis por subpoblaciones es el más adecuado.

- La depresión endogámica puede ser estudiada considerando tanto la endogamia por cromosoma como por longitud. En caracteres cinemáticos puede ser parcialmente explicada por el aumento del nivel de endogamia en cromosomas específicos y por el aumento de endogamia reciente. Se necesitan más estudios con un mayor número de muestras para confirmar este hallazgo.
- Existe un componente genético que afecta longevidad espermática en bovinos, que se puede detectar mediante GWAS. En este estudio se identificaron SNP's candidatos localizados en fase de ligamiento con genes relacionados con el proceso de capacitación espermática, hiperactivación, reacción acrosómica y espermatogénesis.

Bibliografía general

Bibliografía

- Ahmad, M., N. Ahmad, A. Riaz y M. Anzar. Sperm survival kinetics in different types of bull semen: progressive motility, plasma membrane integrity, acrosomal status and reactive oxygen species generation. Reproduction, Fertility and Development. 2015; 27(5): 784-793.
- Ahmed, H., S. M. H. Andrabi, M. Anwar y S. Jahan. Use of post-thaw semen quality parameters to predict fertility of water buffalo (*Bubalus bubalis*) bull during peak breeding season. Andrologia. 2017; 49(4): e12639.
- Aken, B. L., S. Ayling, D. Barrell, L. Clarke, V. Curwen, S. Fairley, J. Fernandez Banet, K. Billis, C. García Girón, T. Hourlier, K. Howe, A. Kähäri, F. Kokocinski, F. J. Martin, D. N. Murphy, R. Nag, M. Ruffier, M. Schuster, Y. A. Tang, J.-H. Vogel, S. White, A. Zadissa, P. Flicek y S. M. J. Searle. The Ensembl gene annotation system. Database. 2016; 2016.
- Alavioon, G., A. Cabrera Garcia, M. LeChatelier, A. A. Maklakov y S. Immler. Selection for longer lived sperm within ejaculate reduces reproductive ageing in offspring. Evol Lett. 2019; 3(2): 198-206.
- Amann, R. P. y D. Waberski. Computer-assisted sperm analysis (CASA): capabilities and potential developments. Theriogenology. 2014; 81(1): 5-17.e11-13.
- Andere, C. I., N. Rubio, E. Rodriguez, I. Aguilar y D. Casanova. Análisis de la consanguinidad de la población de bovinos Holando inscriptos en el sistema de Control Lechero Oficial de la República Argentina. RIA. Revista de investigaciones agropecuarias. 2017; 43(1): 92-97.
- Antonios, S., S. T. Rodríguez-Ramilo, I. Aguilar, J. M. Astruc, A. Legarra y Z. G. Vitezica. Genomic and pedigree estimation of inbreeding depression for semen traits in the Basco-Béarnaise dairy sheep breed. Journal of Dairy Science. 2021; 104(3): 3221-3230.
- Awata, J., S. Takada, C. Standley, K. F. Lechtreck, K. D. Bellvé, G. J. Pazour, K. E. Fogarty y G. B. Witman. NPHP4 controls ciliary trafficking of membrane proteins and large soluble proteins at the transition zone. Journal of Cell Science. 2014; 127(21): 4714-4727.
- Azcona, F., M. Valera, A. Molina, P. Trigo, P. P. García, M. Solé y S. Demyda-Peyrás. Impact of reproductive biotechnologies on genetic variability of Argentine Polo horses. Livestock Science. 2019: 103848.
- Baes, C. F., B. O. Mankanjuola, F. Miglior, G. Marras, J. T. Howard, A. Fleming y C. Maltecca. Symposium review: The genomic architecture of inbreeding: How homozygosity affects health and performance. Journal of Dairy Science. 2019; 102(3): 2807-2817.
- Balloux, F., W. Amos y T. Coulson. Does heterozygosity estimate inbreeding in real populations? Molecular Ecology. 2004; 13(10): 3021-3031.
- Barquero, V., E. R. S. Roldan, C. Soler, J. L. Yániz, M. Camacho y A. Valverde. Predictive Capacity of Boar Sperm Morphometry and Morphometric Sub-Populations on Reproductive Success after Artificial Insemination. Animals. 2021; 11(4): 920.
- Barth, A. D. Factors Affecting Fertility with Artificial Insemination. Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice. 1993; 9(2): 275-289.
- Barth, A. D. CHAPTER 31 - Evaluation of Potential Breeding Soundness of the Bull. En: *Current Therapy in Large Animal Theriogenology (Second Edition)*. R. S. Youngquist y W. R. Threlfall. Saint Louis, W.B. Saunders. 2007: 228-240.
- Bates, D., M. Mächler, B. Bolker y S. Walker. Fitting Linear Mixed-Effects Models Using lme4. Journal of Statistical Software. 2015; 67(1): 1 - 48.
- Baumung, R. y J. Sölkner. Pedigree and marker information requirements to monitor genetic variability. Genetics Selection Evolution. 2003; 35(5): 369.
- Beletti, M. E., F. Costa Lda y M. P. Viana. A comparison of morphometric characteristics of sperm from fertile *Bos taurus* and *Bos indicus* bulls in Brazil. Animal Reproduction Science. 2005; 85(1-2): 105-116.

- Beltman, M. E., N. Forde, P. Furney, F. Carter, J. F. Roche, P. Lonergan y M. A. Crowe. Characterisation of endometrial gene expression and metabolic parameters in beef heifers yielding viable or non-viable embryos on Day 7 after insemination. Reproduction, Fertility and Development. 2010; 22(6): 987-999.
- Beltman, M. E., N. Forde, P. Lonergan y M. A. Crowe. Altered endometrial immune gene expression in beef heifers with retarded embryos. Reproduction, Fertility and Development. 2013; 25(6): 966-970.
- Bertrand, A. R., N. K. Kadri, L. Flori, M. Gautier y T. Druet. RZooRoH: An R package to characterize individual genomic autozygosity and identify homozygous-by-descent segments. Methods in Ecology and Evolution. 2019; 10(6): 860-866.
- Bezanson, J., A. Edelman, S. Karpinski y V. B. Shah. Julia: A Fresh Approach to Numerical Computing. SIAM Review. 2017; 59(1): 65-98.
- Biffani, S., A. Samoré y F. Canavesi. Inbreeding depression for production, reproduction and functional traits in Italian Holstein cattle. Proceedings of the 7th World Congress on genetics applied to livestock production, 2002 374.
- Biscarini, F., S. Biffani, N. Morandi, E. L. Nicolazzi y A. Stella. Using runs of homozygosity to detect genomic regions associated with susceptibility to infectious and metabolic diseases in dairy cows under intensive farming conditions. arXiv. 2016.
- Biscarini, F. B., Stefano; Stella, Alessandra. Más allá del GWAS: alternativas para localizar QTLs (In Spanish). arXiv. 2015.
- Bjelland, D. W., K. A. Weigel, A. D. Coburn y R. D. Wilson. Using a family-based structure to detect the effects of genomic inbreeding on embryo viability in Holstein cattle. Journal of Dairy Science. 2015; 98(7): 4934-4944.
- Bjelland, D. W., K. A. Weigel, N. Vukasinovic y J. D. Nkrumah. Evaluation of inbreeding depression in Holstein cattle using whole-genome SNP markers and alternative measures of genomic inbreeding. Journal of Dairy Science. 2013; 96(7): 4697-4706.
- Blengini, C. S., N. Sergio, C. Gabriela, L. C. Giojalas y C. Margarita. Variability in sperm form and function in the context of sperm competition risk in two Tupinambis lizards. Ecol Evol. 2014; 4(21): 4080-4092.
- Boersma, A. A., J. Braun y R. Stolla. Influence of Random Factors and Two Different Staining Procedures on Computer-assisted Sperm Head Morphometry in Bulls. Reproduction in Domestic Animals. 1999; 34(2): 77-82.
- Bomba, L., E. L. Nicolazzi, M. Milanese, R. Negrini, G. Mancini, F. Biscarini, A. Stella, A. Valentini y P. Ajmone-Marsan. Relative extended haplotype homozygosity signals across breeds reveal dairy and beef specific signatures of selection. Genetics Selection Evolution. 2015; 47(1): 25.
- Borowska, A., T. Szwaczkowski, S. Kamiński, D. M. Hering, W. Kordan y M. Lecewicz. Identification of genome regions determining semen quality in Holstein-Friesian bulls using information theory. Animal Reproduction Science. 2018; 192: 206-215.
- Bosse, M., H.-J. Megens, O. Madsen, Y. Paudel, L. A. F. Frantz, L. B. Schook, R. P. M. A. Crooijmans y M. A. M. Groenen. Regions of Homozygosity in the Porcine Genome: Consequence of Demography and the Recombination Landscape. PLOS Genetics. 2012; 8(11): e1003100.
- Breitbart, H. Intracellular calcium regulation in sperm capacitation and acrosomal reaction. Molecular and Cellular Endocrinology. 2002; 187(1): 139-144.
- Brito, L. F., A. E. Silva, L. H. Rodrigues, F. V. Vieira, L. A. Deragon y J. P. Kastelic. Effects of environmental factors, age and genotype on sperm production and semen quality in Bos indicus and Bos taurus AI bulls in Brazil. Animal Reproduction Science. 2002; 70(3-4): 181-190.
- Burren, A., H. Joerg, M. Erbe, A. R. Gilmour, U. Witschi y F. Schmitz-Hsu. Genetic parameters for semen production traits in Swiss dairy bulls. Reproduction in Domestic Animals. 2019; 54(9): 1177-1181.

- Butler, J. E., W. C. Hamilton, R. G. Sasser, C. A. Ruder, G. M. Hass y R. J. Williams. Detection and Partial Characterization of Two Bovine Pregnancy-Specific Proteins¹². Biology of Reproduction. 1982; 26(5): 925-933.
- Caballero, A. y M. A. Toro. Analysis of genetic diversity for the management of conserved subdivided populations. Conservation Genetics. 2002; 3(3): 289-299.
- Carolino, N. y L. T. Gama. Inbreeding depression on beef cattle traits: Estimates, linearity of effects and heterogeneity among sire-families. Genetics Selection Evolution. 2008; 40(5): 511.
- Carothers, A. D., I. Rudan, I. Kolcic, O. Polasek, C. Hayward, A. F. Wright, H. Campbell, P. Teague, N. D. Hastie y J. L. Weber. Estimating Human Inbreeding Coefficients: Comparison of Genealogical and Marker Heterozygosity Approaches. Annals of Human Genetics. 2006; 70(5): 666-676.
- Carvajal-Rodríguez, A., J. de Uña-Alvarez y E. Rolán-Alvarez. A new multitest correction (SGoF) that increases its statistical power when increasing the number of tests. BMC Bioinformatics. 2009; 10: 209.
- Cassell, B. G., V. Adamec y R. E. Pearson. Effect of Incomplete Pedigrees on Estimates of Inbreeding and Inbreeding Depression for Days to First Service and Summit Milk Yield in Holsteins and Jerseys. Journal of Dairy Science. 2003; 86(9): 2967-2976.
- Cecchi, F., R. Ciampolini, E. Castellana y E. Ciani. Genetic diversity within and among endangered local cattle breeds from Tuscany (Italy). Large Animal Review. 2012; 18(2): 79-85.
- Celeghini, E. C. C., R. P. de Arruda, A. F. C. de Andrade, J. Nascimento, C. F. Raphael y P. H. M. Rodrigues. Effects that bovine sperm cryopreservation using two different extenders has on sperm membranes and chromatin. Animal Reproduction Science. 2008; 104(2): 119-131.
- Chang, C. C., C. C. Chow, L. C. Tellier, S. Vattikuti, S. M. Purcell y J. J. Lee. Second-generation PLINK: rising to the challenge of larger and richer datasets. GigaScience. 2015; 4(1).
- Charlesworth, B. The effect of synergistic epistasis on the inbreeding load. Genet Res. 1998; 71(1): 85-89.
- Charlesworth, D. y B. Charlesworth. Inbreeding Depression and Its Evolutionary Consequences. Annual Review of Ecology and Systematics. 1987; 18(1): 237-268.
- Charlesworth, D. y J. H. Willis. The genetics of inbreeding depression. Nature Reviews Genetics. 2009; 10(11): 783-796.
- Chen, F., L. Gao, H. Zhou, L. Guo, Q. Chen, Y. Gan, X. Sun, Q. Li y K. Wang. The association between sperm head elongation and semen quality. Andrology. 2019; 7(6): 840-845.
- Chenoweth, P. J. Sexual behavior of the bull: a review. Journal of Dairy Science. 1983; 66(1): 173-179.
- Chenoweth, P. J. Genetic sperm defects. Theriogenology. 2005; 64(3): 457-468.
- Chenoweth, P. J. y F. J. McPherson. Bull breeding soundness, semen evaluation and cattle productivity. Animal Reproduction Science. 2016; 169: 32-36.
- Cochran, S. D., J. B. Cole, D. J. Null y P. J. Hansen. Single Nucleotide Polymorphisms in Candidate Genes Associated with Fertilizing Ability of Sperm and Subsequent Embryonic Development in Cattle. Biology of Reproduction. 2013; 89(3).
- Cohen, G., S. Rubinstein, Y. Gur y H. Breitbart. Crosstalk between protein kinase A and C regulates phospholipase D and F-actin formation during sperm capacitation. Developmental Biology. 2004; 267(1): 230-241.
- Commun, L., K. Velek, J.-B. Barbry, S. Pun, A. Rice, A. Mestek, C. Egli y S. Leterme. Detection of pregnancy-associated glycoproteins in milk and blood as a test for early pregnancy in dairy cows. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation. 2016; 28(3): 207-213.
- Cortes-Hernández, J. G., F. J. Ruiz-López, C. G. Vásquez-Peláez y A. García-Ruiz. Runs of homocigosity and its association with productive traits in Mexican Holstein cattle. PLOS ONE. 2022; 17(9): e0274743.
- Corva, P., M. Colavita, G. Legaz y M. Martínez. Genealogical and molecular analysis of an Argentinean Angus seedstock herd. BAG. Journal of basic and applied genetics. 2015; 26(2): 17-28.

- Coutton, C., A. S. Vargas, A. Amiri-Yekta, Z.-E. Kherraf, S. F. Ben Mustapha, P. Le Tanno, C. Wambergue-Legrand, T. Karaouzène, G. Martinez, S. Crouzy, A. Daneshpour, S. H. Hosseini, V. Mitchell, L. Halouani, O. Marrakchi, M. Makni, H. Latrous, M. Kharouf, J.-F. Deleuze, A. Boland, S. Hennebicq, V. Satre, P.-S. Jouk, N. Thierry-Mieg, B. Conne, D. Dacheux, N. Landrein, A. Schmitt, L. Stouvenel, P. Lorès, E. El Khouri, S. P. Bottari, J. Fauré, J.-P. Wolf, K. Pernet-Gallay, J. Escoffier, H. Gourabi, D. R. Robinson, S. Nef, E. Dulioust, R. Zouari, M. Bonhivers, A. Touré, C. Arnoult y P. F. Ray. Mutations in CFAP43 and CFAP44 cause male infertility and flagellum defects in *Trypanosoma* and human. Nature Communications. 2018; 9(1): 686.
- Croquet, C., P. Mayeres, A. Gillon, H. Hammami, H. Soyeurt, S. Vanderick y N. Gengler. Linear and Curvilinear Effects of Inbreeding on Production Traits for Walloon Holstein Cows. Journal of Dairy Science. 2007; 90(1): 465-471.
- Curik, I., M. Ferenčaković y J. Sölkner. Inbreeding and runs of homozygosity: A possible solution to an old problem. Livestock Science. 2014; 166: 26-34.
- Curik, I., M. Ferenčaković y J. Sölkner. Genomic dissection of inbreeding depression: a gate to new opportunities. Revista Brasileira de Zootecnia [online]. 2017; 46(9): 773-782.
- Curtis, D., A. E. Vine y J. Knight. Study of Regions of Extended Homozygosity Provides a Powerful Method to Explore Haplotype Structure of Human Populations. Annals of Human Genetics. 2008; 72(2): 261-278.
- David, I., P. Kohnke, G. Lagriffoul, O. Praud, F. Plouarboué, P. Degond y X. Druart. Mass sperm motility is associated with fertility in sheep. Animal Reproduction Science. 2015; 161: 75-81.
- de Roos, A. P. W., C. Schrooten, R. F. Veerkamp y J. A. M. van Arendonk. Effects of genomic selection on genetic improvement, inbreeding, and merit of young versus proven bulls. Journal of Dairy Science. 2011; 94(3): 1559-1567.
- Demott, R. P. y S. S. Suarez. Hyperactivated sperm progress in the mouse oviduct. Biology of Reproduction. 1992; 46(5): 779-785.
- Devlin, B. y K. Roeder. Genomic control for association studies. Biometrics. 1999; 55(4): 997-1004.
- Dini, P., T. Bartels, I. Revah, A. N. Claes, T. A. E. Stout y P. Daels. A retrospective study on semen quality parameters from four different Dutch horse breeds with different levels of inbreeding. Theriogenology. 2020; 157: 18-23.
- Diniz, D. B., M. S. Lopes, M. L. W. J. Broekhuijse, P. S. Lopes, B. Harlizius, S. E. F. Guimarães, N. Duijvesteijn, E. F. Knol y F. F. Silva. A genome-wide association study reveals a novel candidate gene for sperm motility in pigs. Animal Reproduction Science. 2014; 151(3): 201-207.
- Diniz, J. V. A., R. A. Satrapa, L. G. T. M. Segabinazzi, J. A. M. Carneiro, E. Oba, F. O. Papa, C. d. P. F. Dell'Aqua, B. Loureiro y J. A. D. A. Junior. Sodium caseinate improves longevity and fertility of frozen bull semen. Theriogenology. 2020; 154: 59-65.
- Dixit, S. P., S. Singh, I. Ganguly, A. K. Bhatia, A. Sharma, N. A. Kumar, A. K. Dang y S. Jayakumar. Genome-Wide Runs of Homozygosity Revealed Selection Signatures in *Bos indicus*. Frontiers in Genetics. 2020; 11.
- Doekes, H. P., P. Bijma, R. F. Veerkamp, G. de Jong, Y. C. J. Wientjes y J. J. Windig. Inbreeding depression across the genome of Dutch Holstein Friesian dairy cattle. Genetics Selection Evolution. 2020; 52(1): 64.
- Doekes, H. P., R. F. Veerkamp, P. Bijma, G. de Jong, S. J. Hiemstra y J. J. Windig. Inbreeding depression due to recent and ancient inbreeding in Dutch Holstein–Friesian dairy cattle. Genetics Selection Evolution. 2019; 51(1): 54.
- Dorado, J., R. M. Cid, A. Molina, M. Hidalgo, J. Ariza, M. Moreno-Millan y S. Demyda-Peyras. Effect of inbreeding depression on bull sperm quality and field fertility. Reproduction, Fertility and Development. 2015; 4: 712-720.
- Druet, T. y M. Gautier. A model-based approach to characterize individual inbreeding at both global and local genomic scales. Molecular Ecology. 2017; 26(20): 5820-5841.

- Enciso, M., H. Cisale, S. D. Johnston, J. Sarasa, J. L. Fernández y J. Gosálvez. Major morphological sperm abnormalities in the bull are related to sperm DNA damage. Theriogenology. 2011; 76(1): 23-32.
- Ercanbrack, S. K. y A. D. Knight. Effects of inbreeding on reproduction and wool production of Rambouillet, Targhee, and Columbia ewes1. Journal of Animal Science. 1991; 69(12): 4734-4744.
- Falconer, D. S. y T. F. C. Mackay. Introduction to quantitative genetics, Longman, Essex, England, 1996.
- Farrell, P. B., G. A. Presicce, C. C. Brockett y R. H. Foote. Quantification of bull sperm characteristics measured by computer-assisted sperm analysis (CASA) and the relationship to fertility. Theriogenology. 1998; 49(4): 871-879.
- Ferenčaković, M., E. Hamzić, B. Gredler, T. R. Solberg, G. Klemetsdal, I. Curik y J. Sölkner. Estimates of autozygosity derived from runs of homozygosity: empirical evidence from selected cattle populations. Journal of Animal Breeding and Genetics. 2013; 130(4): 286-293.
- Ferenčaković, M., J. Sölkner y I. Curik. Estimating autozygosity from high-throughput information: effects of SNP density and genotyping errors. Genetics Selection Evolution. 2013; 45(1): 42.
- Ferenčaković, M., J. Sölkner, M. Kapš y I. Curik. Genome-wide mapping and estimation of inbreeding depression of semen quality traits in a cattle population. Journal of Dairy Science. 2017; 100(6): 4721-4730.
- Ferencakovic, M. H., Edin ; Gredler, Birgit ; Curik, Ino ; Sölkner, Johann Runs of Homozygosity Reveal Genome-wide Autozygosity in the Austrian Fleckvieh Cattle. Agriculturae Conspectus Scientificus (ACS). 2011; 76(4): 325-328.
- Fernández, J. y M. A. Toro. A new method to estimate relatedness from molecular markers. Molecular Ecology. 2006; 15(6): 1657-1667.
- Ferraz, M. A. M. M., R. Morató, M. Yeste, N. Arcarons, A. I. Pena, C. Tamargo, C. O. Hidalgo, R. Muiño y T. Mogas. Evaluation of sperm subpopulation structure in relation to in vitro sperm–oocyte interaction of frozen-thawed semen from Holstein bulls. Theriogenology. 2014; 81(8): 1067-1072.
- Fisher, R. A. A fuller theory of “Junctions” in inbreeding. Heredity. 1954; 8(2): 187-197.
- Fitzmaurice, G. M. y C. Ravichandran. A Primer in Longitudinal Data Analysis. Circulation. 2008; 118(19): 2005-2010.
- Fitzpatrick, J. L., F. Garcia-Gonzalez y J. P. Evans. Linking sperm length and velocity: the importance of intramale variation. Biology Letters. 2010; 6(6): 797-799.
- Fomitcheva, J., M. E. Baker, E. Anderson, G. Y. Lee y N. Aziz. Characterization of Ke 6, a new 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase, and its expression in gonadal tissues. Journal of Biological Chemistry. 1998; 273(35): 22664-22671.
- Fonseca, P. A. S., F. C. Dos Santos, S. Lam, A. Suárez-Vega, F. Miglior, F. S. Schenkel, L. A. F. Diniz, S. Id-Lahoucine, M. R. S. Carvalho y A. Cánovas. Genetic mechanisms underlying spermatid and testicular traits within and among cattle breeds: systematic review and prioritization of GWAS results. Journal of Animal Science. 2018; 96(12): 4978-4999.
- Fordyce, G., K. Entwistle, S. Norman, V. Perry, B. Gardiner y P. Fordyce. Standardising bull breeding soundness evaluations and reporting in Australia. Theriogenology. 2006; 66(5): 1140-1148.
- Fornieris, N. S., C. A. Garcia-Baccino, R. J. C. Cantet y Z. G. Vitezica. Estimating inbreeding depression for growth and reproductive traits using pedigree and genomic methods in Argentinean Brangus cattle. Journal of Animal Science. 2021; 99(11).
- Fortes, M. R. S., L. R. Porto-Neto, N. Satake, L. T. Nguyen, A. C. Freitas, T. P. Melo, D. C. B. Scaletz, B. Hayes, F. S. S. Raidan, A. Reverter y G. B. Boe-Hansen. X chromosome variants are associated with male fertility traits in two bovine populations. Genetics Selection Evolution. 2020; 52(1): 46.
- Frankham, R. Inbreeding and Extinction: A Threshold Effect. Conservation Biology. 1995; 9(4): 792-799.

- Franklin, I. R. The distribution of the proportion of the genome which is homozygous by descent in inbred individuals. Theoretical Population Biology. 1977; 11(1): 60-80.
- Fusser, M., S. Kernstock, V. K. Aileni, W. Egge-Jacobsen, P. Ø. Falnes y A. Klungland. Lysine Methylation of the Valosin-Containing Protein (VCP) Is Dispensable for Development and Survival of Mice. PLOS ONE. 2015; 10(11): e0141472.
- Gadea, J. Sperm factors related to in vitro and in vivo porcine fertility. Theriogenology. 2005; 63(2): 431-444.
- Gallego, V., J. G. Herranz-Jusado, C. Rozenfeld, L. Pérez y J. F. Asturiano. Subjective and objective assessment of fish sperm motility: when the technique and technicians matter. Fish Physiology and Biochemistry. 2018; 44(6): 1457-1467.
- Garbi, M., S. Rubinstein, Y. Lax y H. Breitbart. Activation of Protein Kinase C α in the Lysophosphatidic Acid-Induced Bovine Sperm Acrosome Reaction and Phospholipase D1 Regulation1. Biology of Reproduction. 2000; 63(5): 1271-1277.
- García-Dorado, A. Understanding and predicting the fitness decline of shrunk populations: inbreeding, purging, mutation, and standard selection. Genetics. 2012; 190(4): 1461-1476.
- García-Herreros, M. y C. L. V. Leal. Sperm morphometry: a tool for detecting biophysical changes associated with viability in cryopreserved bovine spermatozoa. Andrologia. 2014; 46(7): 820-822.
- García-Ispierto, I., M. A. Rosselló-Visa, B. Serrano-Pérez, R. Mur-Novales, N. M. de Sousa, J. F. Beckers y F. López-Gatius. Plasma concentrations of pregnancy-associated glycoproteins I and II and progesterone on day 28 post-AI as markers of twin pregnancy in dairy cattle. Livestock Science. 2016; 192: 44-47.
- García-Vázquez, F., J. Gadea, C. Matás y W. Holt. Importance of sperm morphology during sperm transport and fertilization in mammals. Asian journal of andrology. 2016; 18(6): 844-850.
- Gatea, A. O., M. F. Smith, K. G. Pohler, T. Egen, M. H. C. Pereira, J. L. M. Vasconcelos, J. C. Lawrence y J. A. Green. The ability to predict pregnancy loss in cattle with ELISAs that detect pregnancy associated glycoproteins is antibody dependent. Theriogenology. 2018; 108: 269-276.
- Gibson, J., N. E. Morton y A. Collins. Extended tracts of homozygosity in outbred human populations. Human Molecular Genetics. 2006; 15(5): 789-795.
- Gmel, A. I., D. Burger y M. Neuditschko. A Novel QTL and a Candidate Gene Are Associated with the Progressive Motility of Franches-Montagnes Stallion Spermatozoa after Thaw. Genes. 2021; 12(10): 1501.
- Gomendio, M. y E. R. Roldan. Implications of diversity in sperm size and function for sperm competition and fertility. Int J Dev Biol. 2008; 52(5-6): 439-447.
- González-Recio, O., E. López de Maturana y J. P. Gutiérrez. Inbreeding Depression on Female Fertility and Calving Ease in Spanish Dairy Cattle. Journal of Dairy Science. 2007; 90(12): 5744-5752.
- Gosálvez, J., C. López-Fernández, J. L. Fernández, A. Gouraud y W. V. Holt. Relationships between the dynamics of iatrogenic DNA damage and genomic design in mammalian spermatozoa from eleven species. Mol Reprod Dev. 2011; 78(12): 951-961.
- Goszczynski, D., A. Molina, E. Terán, H. Morales-Durand, P. Ross, H. Cheng, G. Giovambattista y S. Demyda-Peyrás. Runs of homozygosity in a selected cattle population with extremely inbred bulls: Descriptive and functional analyses revealed highly variable patterns. PLOS ONE. 2018; 13(7).
- Gottschalk, M., J. Metzger, G. Martinsson, H. Sieme y O. Distl. Genome-wide association study for semen quality traits in German Warmblood stallions. Animal Reproduction Science. 2016; 171: 81-86.
- Gravance, C. G., M. E. Casey y P. J. Casey. Pre-freeze bull sperm head morphometry related to post-thaw fertility. Animal Reproduction Science. 2009; 114(1-3): 81-88.
- Gravance, C. G., Z. J. Champion y P. J. Casey. Computer-assisted sperm head morphometry analysis (ASMA) of cryopreserved ram spermatozoa. Theriogenology. 1998; 49(6): 1219-1230.

- Grötter, L. G., L. Cattaneo, P. E. Marini, M. E. Kjelland y L. B. Ferré. Recent advances in bovine sperm cryopreservation techniques with a focus on sperm post-thaw quality optimization. Reproduction in Domestic Animals. 2019; 54(4): 655-665.
- Guo, R., Z. Yu, J. Guan, Y. Ge, J. Ma, S. Li, S. Wang, S. Xue y D. Han. Stage-specific and tissue-specific expression characteristics of differentially expressed genes during mouse spermatogenesis. Mol Reprod Dev. 2004; 67(3): 264-272.
- Gurgul, A., T. Szmatoła, P. Topolski, I. Jasielczuk, K. Żukowski y M. Bugno-Poniewierska. The use of runs of homozygosity for estimation of recent inbreeding in Holstein cattle. Journal of Applied Genetics. 2016; 57(4): 527-530.
- Gutiérrez, J. P. y F. Goyache. A note on ENDOG: a computer program for analysing pedigree information. Journal of Animal Breeding and Genetics. 2005; 122(3): 172-176.
- Gutiérrez, J. P., L. J. Royo, I. Álvarez y F. Goyache. MolKin v2.0: A Computer Program for Genetic Analysis of Populations Using Molecular Coancestry Information. Journal of Heredity. 2005; 96(6): 718-721.
- Halkidi, M., Y. Batistakis y M. Vazirgiannis. Cluster Validity Methods: Part I. SIGMOD Record. 2002; 31.
- Hansen, L. B. Consequences of Selection for Milk Yield from a Geneticist's Viewpoint. Journal of Dairy Science. 2000; 83(5): 1145-1150.
- Hedrick, P. W. y A. Garcia-Dorado. Understanding Inbreeding Depression, Purging, and Genetic Rescue. Trends in Ecology & Evolution. 2016; 31(12): 940-952.
- Helfenstein, F., M. Pödevin y H. Richner. Sperm morphology, swimming velocity, and longevity in the house sparrow *Passer domesticus*. Behavioral Ecology and Sociobiology. 2010; 64(4): 557-565.
- Hering, D., M. Lecewicz, W. Kordan y S. Kaminski. Single nucleotide polymorphism within arylsulfatase D gene (ARSD) is associated with selected kinematic parameters of sperm motility in Holstein-Friesian bulls. Polish Journal of Veterinary Sciences. 2014;(No 3).
- Hering, D. M., K. Olenski y S. Kaminski. Genome-wide association study for poor sperm motility in Holstein-Friesian bulls. Animal Reproduction Science. 2014; 146(3): 89-97.
- Hidalgo, M., I. Rodriguez y J. Dorado. Influence of staining and sampling procedures on goat sperm morphometry using the Sperm Class Analyzer. Theriogenology. 2006; 66(4): 996-1003.
- Hidalgo, M. M. T., A. B. M. d. Almeida, F. L. Z. d. Moraes, R. Y. P. Marubayashi, F. F. d. Souza, T. R. R. Barreiros y M. I. M. Martins. Sperm subpopulations influence the pregnancy rates in cattle. Reproduction in Domestic Animals. 2021; 56(8): 1117-1127.
- Hildebrandt, F., S. F. Heeringa, F. Rüschenhof, M. Attanasio, G. Nürnberg, C. Becker, D. Seelow, N. Huebner, G. Chernin, C. N. Vlangos, W. Zhou, J. F. O'Toole, B. E. Hoskins, M. T. F. Wolf, B. G. Hinkes, H. Chaib, S. Ashraf, D. S. Schoeb, B. Ovunc, S. J. Allen, V. Vega-Warner, E. Wise, H. M. Harville, R. H. Lyons, J. Washburn, J. Macdonald, P. Nürnberg y E. A. Otto. A systematic approach to mapping recessive disease genes in individuals from outbred populations. PLOS Genetics. 2009; 5(1): e1000353-e1000353.
- Hill, W. G. y B. S. Weir. Variation in actual relationship as a consequence of Mendelian sampling and linkage. Genetics Research. 2011; 93(1): 47-64.
- Hinkson, K. M. y S. Poo. Inbreeding depression in sperm quality in a critically endangered amphibian. Zoo Biology. 2020; 39: 197-204.
- Ho, H.-C. y S. S. Suarez. An Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptor-Gated Intracellular Ca²⁺ Store Is Involved in Regulating Sperm Hyperactivated Motility1. Biology of Reproduction. 2001; 65(5): 1606-1615.
- Hockett, M. E., N. R. Rohrbach y F. N. Schrick. Alterations in embryo development in progestogen-supplemented cows administered prostaglandin F_{2α}. Prostaglandins & Other Lipid Mediators. 2004; 73(3): 227-236.
- Hoflack, G., G. Opsomer, T. Rijsselaere, A. Van Soom, D. Maes, A. De Kruif y L. Duchateau. Comparison of Computer-assisted Sperm Motility Analysis Parameters in Semen from Belgian Blue and Holstein-Friesian Bulls. Reproduction in Domestic Animals. 2007; 42(2): 153-161.

- Holt, W. V., J. O'Brien y T. Abaigar. Applications and interpretation of computer-assisted sperm analyses and sperm sorting methods in assisted breeding and comparative research. Reproduction, Fertility and Development. 2007; 19(6): 709-718.
- Hook, K. A. y H. S. Fisher. Methodological considerations for examining the relationship between sperm morphology and motility. Mol Reprod Dev. 2020; 87(6): 633-649.
- Hooshmandabbasi, R., H. Zerbe, S. Bauersachs, N. M. de Sousa, A. Boos y K. Klisch. Pregnancy-associated glycoproteins in cows with retained fetal membranes. Theriogenology. 2018; 105: 158-163.
- Howard, J. T., J. E. Pryce, C. Baes y C. Maltecca. Invited review: Inbreeding in the genomics era: Inbreeding, inbreeding depression, and management of genomic variability. Journal of Dairy Science. 2017; 100(8): 6009-6024.
- Howard, J. T., F. Tiezzi, Y. Huang, K. A. Gray y C. Maltecca. A heuristic method to identify runs of homozygosity associated with reduced performance in livestock. Journal of Animal Science. 2017; 95(10): 4318-4332.
- Howrigan, D. P., M. A. Simonson y M. C. Keller. Detecting autozygosity through runs of homozygosity: A comparison of three autozygosity detection algorithms. BMC Genomics. 2011; 12(1): 460.
- Hu, Z.-L., C. A. Park y J. M. Reecy. Bringing the Animal QTLdb and CorrDB into the future: meeting new challenges and providing updated services. Nucleic Acids Research. 2021; 50(D1): D956-D961.
- Huang da, W., B. T. Sherman y R. A. Lempicki. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. Nature Protocols. 2009; 4(1): 44-57.
- Ibanescu, I., M. Siuda y H. Bollwein. Motile sperm subpopulations in bull semen using different clustering approaches – Associations with flow cytometric sperm characteristics and fertility. Animal Reproduction Science. 2020; 215: 106329.
- Iso-Touru, T., C. Wurmser, H. Venhoranta, M. Hiltpold, T. Savolainen, A. Sironen, K. Fischer, K. Flisikowski, R. Fries, A. Vicente-Carrillo, M. Alvarez-Rodriguez, S. Nagy, M. Mutikainen, J. Peippo, J. Taponen, G. Sahana, B. Guldbrandtsen, H. Simonen, H. Rodriguez-Martinez, M. Andersson y H. Pausch. A splice donor variant in CCDC189 is associated with asthenospermia in Nordic Red dairy cattle. BMC Genomics. 2019; 20(1): 286.
- Jiménez, J. M., M. Criado y A. Molina. Las razas bovinas andaluzas de fomento: Retinto, Lidia. En: Las razas ganaderas de Andalucía (Volumen II). J. d. Andalucía. y C. d. A. y. Pesca., Viceconsejería. Servicio de Publicaciones y Divulgación. 2007: 9-52.
- Kallweit, E. y U. Baulain. Reproduction performance and degree of inbreeding in a small Finnsheep population during a 34-year period, 2001-2036, Dummerstorf. Archives Animal Breeding.
- Kamiński, S., D. M. Hering, K. Oleński, M. Lecewicz y W. Kordan. Genome-wide association study for sperm membrane integrity in frozen-thawed semen of Holstein-Friesian bulls. Animal Reproduction Science. 2016; 170: 135-140.
- Kardos, M., M. Åkesson, T. Fountain, Ø. Flagstad, O. Liberg, P. Olason, H. Sand, P. Wabakken, C. Wikenros y H. Ellegren. Genomic consequences of intensive inbreeding in an isolated wolf population. Nature Ecology & Evolution. 2018; 2(1): 124-131.
- Kardos, M., G. Luikart y F. W. Allendorf. Measuring individual inbreeding in the age of genomics: marker-based measures are better than pedigrees. Heredity (Edinb). 2015; 115(1): 63-72.
- Kardos, M., A. Qvarnström y H. Ellegren. Inferring Individual Inbreeding and Demographic History from Segments of Identity by Descent in *Ficedula* Flycatcher Genome Sequences. Genetics. 2017; 205(3): 1319-1334.
- Kastelic, J. y J. Thundathil. Breeding Soundness Evaluation and Semen Analysis for Predicting Bull Fertility. Reproduction in Domestic Animals. 2008; 43(s2): 368-373.
- Kathiravan, P., J. Kalatharan, M. J. Edwin y C. Veerapandian. Computer automated motion analysis of crossbred bull spermatozoa and its relationship with in vitro fertility in zona-free hamster oocytes. Animal Reproduction Science. 2008; 104(1): 9-17.

- Kathiravan, P., J. Kalatharan, G. Karthikeya, K. Rengarajan y G. Kadirvel. Objective sperm motion analysis to assess dairy bull fertility using computer-aided system--a review. Reproduction in Domestic Animals. 2011; 46(1): 165-172.
- Keller, L. F. y D. M. Waller. Inbreeding effects in wild populations. Trends in Ecology & Evolution. 2002; 17(5): 230-241.
- Keller, M. C., P. M. Visscher y M. E. Goddard. Quantification of inbreeding due to distant ancestors and its detection using dense single nucleotide polymorphism data. Genetics. 2011; 189(1): 237-249.
- Kim, E.-S., T. S. Sonstegard, C. P. Van Tassell, G. Wiggans y M. F. Rothschild. The Relationship between Runs of Homozygosity and Inbreeding in Jersey Cattle under Selection. PLOS ONE. 2015; 10(7): e0129967.
- Kipper, B. H., J. T. Trevizan, J. T. Carreira, I. R. Carvalho, G. Z. Mingoti, M. E. Beletti, S. H. V. Perri, D. A. Franciscato, J. C. Pierucci y M. B. Koivisto. Sperm morphometry and chromatin condensation in Nelore bulls of different ages and their effects on IVF. Theriogenology. 2017; 87: 154-160.
- Kirin, M., R. McQuillan, C. S. Franklin, H. Campbell, P. M. McKeigue y J. F. Wilson. Genomic Runs of Homozygosity Record Population History and Consanguinity. PLOS ONE. 2010; 5(11): e13996.
- Kościuczuk, E. M., P. Lisowski, J. Jarczak, J. Krzyżewski, L. Zwierzchowski y E. Bagnicka. Expression patterns of β -defensin and cathelicidin genes in parenchyma of bovine mammary gland infected with coagulase-positive or coagulase-negative Staphylococci. BMC Veterinary Research. 2014; 10(1): 246.
- Krishnamoorthy, K. y M. Lee. Improved tests for the equality of normal coefficients of variation. Computational Statistics. 2013; 29: 215-232.
- Kristensen, T. N., J. Dahlgaard y V. Loeschcke. Effects of inbreeding and environmental stress on fitness – using *Drosophila buzzatii* as a model organism. Conservation Genetics. 2003; 4(4): 453-465.
- Kristensen, T. N., K. S. Pedersen, C. J. Vermeulen y V. Loeschcke. Research on inbreeding in the 'omic' era. Trends in Ecology & Evolution. 2010; 25(1): 44-52.
- Kristensen, T. N. y A. C. Sørensen. Inbreeding – lessons from animal breeding, evolutionary biology and conservation genetics. Animal Science. 2007; 80(2): 121-133.
- Křížková, J., V. Čoudková y M. Maršálek. Computer-Assisted Sperm Analysis of Head Morphometry and Kinematic Parameters in Warmblood Stallions Spermatozoa. Journal of Equine Veterinary Science. 2017; 57: 8-17.
- Kukučková, V., N. Moravčíková, M. Ferenčaković, M. Simčič, G. Mészáros, J. Sölkner, A. Trakovická, O. Kadlečík, I. Curik y R. Kasarda. Genomic characterization of Pinzgau cattle: genetic conservation and breeding perspectives. Conservation Genetics. 2017; 18(4): 893-910.
- Lambard, S., I. Galeraud-Denis, G. Martin, R. Levy, A. Chocat y S. Carreau. Analysis and significance of mRNA in human ejaculated sperm from normozoospermic donors: relationship to sperm motility and capacitation. Mol Hum Reprod. 2004; 10(7): 535-541.
- Laseca, N., G. Anaya, Z. Peña, Y. Piroso, A. Molina y S. Demyda Peyrás. Impaired Reproductive Function in Equines: From Genetics to Genomics. Animals. 2021; 11(2): 393.
- Laseca, N., A. Molina, M. Ramón, M. Valera, F. Azcona, A. Encina y S. Demyda-Peyrás. Fine-Scale Analysis of Runs of Homozygosity Islands Affecting Fertility in Mares. Frontiers in veterinary science. 2022; 9: 754028-754028.
- Lavara, R., J. S. Vicente y M. Baselga. Genetic variation in head morphometry of rabbit sperm. Theriogenology. 2013; 80(4): 313-318.
- Lawrence, M., W. Huber, H. Pages, P. Aboyoun, M. Carlson, R. Gentleman, M. T. Morgan y V. J. Carey. Software for computing and annotating genomic ranges. PLoS Computational Biology. 2013; 9(8): e1003118.
- Lawrence, M., G. Mastromonaco, K. Goodrowe, R. M. Santymire, W. Waddell y A. I. Schulte-Hostedde. The effects of inbreeding on sperm morphometry of captive-bred endangered mammals. Canadian Journal of Zoology. 2017; 95(8): 599-606.

- Leroy, G. Inbreeding depression in livestock species: review and meta-analysis. Animal Genetics. 2014; 45(5): 618-628.
- Liu, L. y H. Luo. Whole-Exome Sequencing Identified a Novel Compound Heterozygous Mutation of *LRRC6* in a Chinese Primary Ciliary Dyskinesia Patient. BioMed Research International. 2018; 2018: 1854269.
- Liu, Y., L. Zhang, W. Li, Q. Huang, S. Yuan, Y. Li, J. Liu, S. Zhang, G. Pin, S. Song, P. F. Ray, C. Arnoult, C. Cho, B. Garcia-Reyes, U. Knippschild, J. F. Strauss y Z. Zhang. The sperm-associated antigen 6 interactome and its role in spermatogenesis. REPRODUCTION. 2019; 158(2): 181-197.
- Love, C. C. Relationship between sperm motility, morphology and the fertility of stallions. Theriogenology. 2011; 76(3): 547-557.
- Lozada-Soto, E. A., C. Maltecca, D. Lu, S. Miller, J. B. Cole y F. Tiezzi. Trends in genetic diversity and the effect of inbreeding in American Angus cattle under genomic selection. Genetics Selection Evolution. 2021; 53(1): 50.
- Lu, J. C., Y. F. Huang y N. Q. Lü. Computer-aided sperm analysis: past, present and future. Andrologia. 2014; 46(4): 329-338.
- Luan, T., J. A. Woolliams, J. Odegård, M. Dolezal, S. I. Roman-Ponce, A. Bagnato y T. H. Meuwissen. The importance of identity-by-state information for the accuracy of genomic selection. Genetics Selection Evolution. 2012; 44(1): 28-28.
- Lynch, M. The genetic interpretation of inbreeding depression and outbreeding depression. Evolution. 1991; 45(3): 622-629.
- Ma, L., J. R. O'Connell, P. M. VanRaden, B. Shen, A. Padhi, C. Sun, D. M. Bickhart, J. B. Cole, D. J. Null, G. E. Liu, Y. Da y G. R. Wiggans. Cattle Sex-Specific Recombination and Genetic Control from a Large Pedigree Analysis. PLOS Genetics. 2015; 11(11): e1005387.
- Macedo, A. A., J. F. F. Bittar, P. B. Bassi, J. B. Ronda, E. R. Bittar, J. C. C. Panetto, M. S. S. Araujo, R. L. Santos y O. A. Martins-Filho. Influence of endogamy and mitochondrial DNA on immunological parameters in cattle. BMC Veterinary Research. 2014; 10(1): 79.
- Maignel, L. B., D.; Verrier, E. . Genetic variability of French dairy breeds estimated from pedigree information. Interbull Bull. 1996;(14): 49-54.
- Makanjuola, B. O., C. Maltecca, F. Miglior, F. S. Schenkel y C. F. Baes. Effect of recent and ancient inbreeding on production and fertility traits in Canadian Holsteins. BMC Genomics. 2020; 21(1): 605.
- Malécot, G. The mathematics of heredity, Masson Et C.,1948.
- Malo, A. F., M. Gomendio, J. Garde, B. Lang-Lenton, A. J. Soler y E. R. S. Roldan. Sperm design and sperm function. Biology Letters. 2006; 2(2): 246-249.
- Maroto-Morales, A., O. García-Álvarez, M. Ramón, F. Martínez-Pastor, M. Fernández-Santos, A. Soler y J. Garde. Current status and potential of morphometric sperm analysis. Asian journal of andrology. 2016; 18(6): 863-870.
- Maroto-Morales, A., M. Ramón, O. García-Álvarez, V. Montoro, A. J. Soler, M. R. Fernández-Santos, E. R. S. Roldan, M. D. Pérez-Guzmán y J. J. Garde. Sperm head phenotype and male fertility in ram semen. Theriogenology. 2015; 84(9): 1536-1541.
- Maroto-Morales, A., M. Ramón, O. García-Álvarez, A. J. Soler, M. R. Fernández-Santos, E. R. S. Roldan, M. Gomendio, M. D. Pérez-Guzmán y J. J. Garde. Morphometrically-distinct sperm subpopulations defined by a multistep statistical procedure in Ram ejaculates: Intra- and interindividual variation. Theriogenology. 2012; 77(8): 1529-1539.
- Marquez, B. y S. S. Suarez. Different Signaling Pathways in Bovine Sperm Regulate Capacitation and Hyperactivation1. Biology of Reproduction. 2004; 70(6): 1626-1633.
- Marras, G., G. Gaspa, S. Sorbolini, C. Dimauro, P. Ajmone-Marsan, A. Valentini, J. L. Williams y N. P. P. Macciotta. Analysis of runs of homozygosity and their relationship with inbreeding in five cattle breeds farmed in Italy. Animal Genetics. 2015; 46(2): 110-121.

- Martikainen, K., A. Sironen y P. Uimari. Estimation of intrachromosomal inbreeding depression on female fertility using runs of homozygosity in Finnish Ayrshire cattle. Journal of Dairy Science. 2018; 101(12): 11097-11107.
- Martin, F. J., M. R. Amode, A. Aneja, O. Austine-Orimoloye, Andrey G. Azov, I. Barnes, A. Becker, R. Bennett, A. Berry, J. Bhai, Simarpreet K. Bhurji, A. Bignell, S. Boddu, P. R. Branco Lins, L. Brooks, S. B. Ramaraju, M. Charkhchi, A. Cockburn, L. Da Rin Fiorretto, C. Davidson, K. Dodiya, S. Donaldson, B. El Houdaigui, T. El Naboulsi, R. Fatima, C. G. Giron, T. Genez, G. S. Ghattaoraya, J. G. Martinez, C. Guijarro, M. Hardy, Z. Hollis, T. Hourlier, T. Hunt, M. Kay, V. Kaykala, T. Le, D. Lemos, D. Marques-Coelho, J. C. Marugán, Gabriela A. Merino, Louise P. Mirabueno, A. Mushtaq, Syed N. Hossain, D. N. Ogeh, M. P. Sakthivel, A. Parker, M. Perry, I. Piližota, I. Prosovetskaia, J. G. Pérez-Silva, Ahamed Imran A. Salam, N. Saraiva-Agostinho, H. Schuilenburg, D. Sheppard, S. Sinha, B. Sipos, W. Stark, E. Steed, R. Sukumaran, D. Sumathipala, M.-M. Suner, L. Surapaneni, K. Sutinen, M. Szpak, Francesca F. Tricomi, D. Urbina-Gómez, A. Veidenberg, Thomas A. Walsh, B. Walts, E. Wass, N. Willhoft, J. Allen, J. Alvarez-Jarreta, M. Chakiachvili, B. Flint, S. Giorgetti, L. Haggerty, Garth R. Ilesley, Jane E. Loveland, B. Moore, Jonathan M. Mudge, J. Tate, D. Thybert, Stephen J. Trevanion, A. Winterbottom, A. Frankish, S. E. Hunt, M. Ruffier, F. Cunningham, S. Dyer, Robert D. Finn, Kevin L. Howe, P. W. Harrison, A. D. Yates y P. Flicek. Ensembl 2023. Nucleic Acids Research. 2022; 51(D1): D933-D941.
- Martinez-Pastor, F., V. Garcia-Macias, M. Alvarez, P. Herraiez, L. Anel y P. De Paz. Sperm subpopulations in Iberian red deer epididymal sperm and their changes through the cryopreservation process. Biology of Reproduction. 2005; 72(2): 316-327.
- Martínez-Rocha, R., J. Hidalgo, A. Cesarani, R. Ramírez-Valverde, R. Núñez-Domínguez, J. G. García-Muñiz y J. Domínguez-Viveros. Assessment of Genetic Diversity, Runs of Homozygosity, and Signatures of Selection in Tropical Milking Criollo Cattle Using Pedigree and Genomic Data. Genes. 2022; 13(10): 1896.
- Martínez-Rodríguez, C., M. Alvarez, E. López-Urueña, S. Gomes-Alves, L. Anel-López, J. E. Tizado, L. Anel y P. de Paz. Head morphology of ram spermatozoa is associated with their ability to migrate *in vitro* and correlates with fertility. Reproduction, Fertility and Development. 2016; 28(11): 1825-1837.
- Martinez, G. y C. Garcia. Sexual selection and sperm diversity in primates. Molecular and Cellular Endocrinology. 2020; 518: 110974.
- Mastrangelo, S., E. Ciani, M. T. Sardina, G. Sottile, F. Pilla, B. Portolano y t. B. O. I. Consortium. Runs of homozygosity reveal genome-wide autozygosity in Italian sheep breeds. Animal Genetics. 2018; 49(1): 71-81.
- Mastrangelo, S., M. T. Sardina, M. Tolone, R. Di Gerlando, A. M. Sutura, L. Fontanesi y B. Portolano. Genome-wide identification of runs of homozygosity islands and associated genes in local dairy cattle breeds. Animal. 2018; 12(12): 2480-2488.
- Mastrangelo, S., M. Tolone, R. Di Gerlando, L. Fontanesi, M. T. Sardina y B. Portolano. Genomic inbreeding estimation in small populations: evaluation of runs of homozygosity in three local dairy cattle breeds. Animal. 2016; 10(5): 746-754.
- Mastrangelo, S., M. Tolone, M. T. Sardina, G. Sottile, A. M. Sutura, R. Di Gerlando y B. Portolano. Genome-wide scan for runs of homozygosity identifies potential candidate genes associated with local adaptation in Valle del Belice sheep. Genetics Selection Evolution. 2017; 49(1): 84.
- Mathevon, M., M. M. Buhr y J. C. M. Dekkers. Environmental, Management, and Genetic Factors Affecting Semen Production in Holstein Bulls. Journal of Dairy Science. 1998; 81(12): 3321-3330.
- Maximini, L., B. Fuerst-Waltl, B. Gredler y R. Baumung. Inbreeding depression on semen quality in Austrian dual-purpose simmental bulls. Reproduction in Domestic Animals. 2011; 46(1): e102-104.

- Mayo, L. M., S. G. Moore, S. E. Poock, W. J. Silvia y M. C. Lucy. *Technical note*: Validation of a chemical pregnancy test in dairy cows that uses whole blood, shortened incubation times, and visual readout. Journal of Dairy Science. 2016; 99(9): 7634-7641.
- Mc Parland, S., J. F. Kearney, M. Rath y D. P. Berry. Inbreeding effects on milk production, calving performance, fertility, and conformation in Irish Holstein-Friesians. Journal of Dairy Science. 2007; 90(9): 4411-4419.
- McLaren, W., L. Gil, S. E. Hunt, H. S. Riat, G. R. S. Ritchie, A. Thormann, P. Flicek y F. Cunningham. The Ensembl Variant Effect Predictor. Genome Biology. 2016; 17(1): 122.
- McQuillan, R., A.-L. Leutenegger, R. Abdel-Rahman, C. S. Franklin, M. Pericic, L. Barac-Lauc, N. Smolej-Narancic, B. Janicijevic, O. Polasek, A. Tenesa, A. K. MacLeod, S. M. Farrington, P. Rudan, C. Hayward, V. Vitart, I. Rudan, S. H. Wild, M. G. Dunlop, A. F. Wright, H. Campbell y J. F. Wilson. Runs of Homozygosity in European Populations. The American Journal of Human Genetics. 2008; 83(3): 359-372.
- Melo, T. P. d., G. M. F. de Camargo, L. G. de Albuquerque y R. Carvalheiro. Genome-wide association study provides strong evidence of genes affecting the reproductive performance of Nellore beef cows. PLOS ONE. 2017; 12(5): e0178551.
- Mercadante, P. M., E. S. Ribeiro, C. Risco y A. D. Ealy. Associations between pregnancy-associated glycoproteins and pregnancy outcomes, milk yield, parity, and clinical diseases in high-producing dairy cows. Journal of Dairy Science. 2016; 99(4): 3031-3040.
- Mészáros, G., S. A. Boison, A. M. Pérez O'Brien, M. Ferenčaković, I. Curik, M. V. Da Silva, Y. T. Utsunomiya, J. F. Garcia y J. Sölkner. Genomic analysis for managing small and endangered populations: a case study in Tyrol Grey cattle. Frontiers in Genetics. 2015; 6: 173.
- Metzger, J., M. Karwath, R. Tonda, S. Beltran, L. Águeda, M. Gut, I. G. Gut y O. Distl. Runs of homozygosity reveal signatures of positive selection for reproduction traits in breed and non-breed horses. BMC Genomics. 2015; 16(1): 764.
- Meuwissen, T. H. E. y Z. Luo. Computing inbreeding coefficients in large populations. Genetics Selection Evolution. 1992; 24(4): 305.
- Meyermans, R., W. Gorssen, N. Buys y S. Janssens. How to study runs of homozygosity using PLINK? A guide for analyzing medium density SNP data in livestock and pet species. BMC Genomics. 2020; 21(1): 94.
- Miglior, F., B. Szkotnicki y E. B. Burnside. Analysis of Levels of Inbreeding and Inbreeding Depression in Jersey Cattle. Journal of Dairy Science. 1992; 75(4): 1112-1118.
- Minelli, A., C. Allegrucci, R. Rosati y I. Mezzasoma. Molecular and binding characteristics of IP3 receptors in bovine spermatozoa. Mol Reprod Dev. 2000; 56(4): 527-533.
- Mocé, E. y J. K. Graham. In vitro evaluation of sperm quality. Animal Reproduction Science. 2008; 105(1): 104-118.
- Mocé, E., P. H. Purdy y J. K. Graham. Treating ram sperm with cholesterol-loaded cyclodextrins improves cryosurvival. Animal Reproduction Science. 2010; 118(2): 236-247.
- Modiba, M. C., K. A. Nephawe, J. Wang, N. Hlongwane, K. Hadebe, W. Lu y B. Mtileni. Runs of Homozygosity and Quantitative Trait Locus/Association for Semen Parameters in Selected Chinese and South African Beef Cattle. Animals. 2022; 12(12): 1546.
- Moore, Daniel J., A. Onoufriadis, A. Shoemark, Michael A. Simpson, Petra I. zur Lage, Sandra C. de Castro, L. Bartoloni, G. Gallone, S. Petridi, Wesley J. Woollard, D. Antony, M. Schmidts, T. Didonna, P. Makrythanasis, J. Bevilard, Nigel P. Mongan, J. Djakow, G. Pals, Jane S. Lucas, June K. Marthin, Kim G. Nielsen, F. Santoni, M. Guipponi, C. Hogg, Stylianos E. Antonarakis, Richard D. Emes, Eddie M. K. Chung, Nicholas D. E. Greene, J.-L. Blouin, Andrew P. Jarman y Hannah M. Mitchison. Mutations in *ZMYND10*, a Gene Essential for Proper Axonemal Assembly of Inner and Outer Dynein Arms in Humans and Flies, Cause Primary Ciliary Dyskinesia. The American Journal of Human Genetics. 2013; 93(2): 346-356.

- Morales Cid, R. Nuevos objetivos de selección de la Raza Bovina Retinta: mejora genética de la productividad y de la resistencia al estrés térmico. Estimación de parámetros mediante técnicas de regresión aleatoria y de norma de reacción. Thesis. Type. Universidad de Córdoba (UCO). 2017.
- Morales, R., A. Menendez-Buxadera, C. Aviles y A. Molina. Direct and maternal genetic effects for preweaning growth in Retinta cattle estimated by a longitudinal approach throughout the calving trajectory of the cow. Jornal of Animal Breeding and Genetics. 2013; 130(6): 425-434.
- Morales, R., F. Phocas, M. Sole, S. Demyda-Peyras, A. Menendez-Buxadera y A. Molina. Breeding beef cattle for an extended productive life: Evaluation of selection criteria in the Retinta breed. Livestock Science. 2017; 204: 115-121.
- Mortimer, S. T. y M. A. Swan. Effect of image sampling frequency on established and smoothing-independent kinematic values of capacitating human spermatozoa. Human Reproduction. 1999; 14(4): 997-1004.
- Muiño, R., M. M. Rivera, T. Rigau, J. E. Rodriguez-Gil y A. I. Peña. Effect of different thawing rates on post-thaw sperm viability, kinematic parameters and motile sperm subpopulations structure of bull semen. Animal Reproduction Science. 2008; 109(1): 50-64.
- Muiño, R., C. Tamargo, C. O. Hidalgo y A. I. Peña. Identification of sperm subpopulations with defined motility characteristics in ejaculates from Holstein bulls: Effects of cryopreservation and between-bull variation. Animal Reproduction Science. 2008; 109(1): 27-39.
- Müller-Unterberg, M., S. Wallmann y O. Distl. Effects of inbreeding and other systematic effects on fertility of Black Forest Draught horses in Germany. Acta Veterinaria Scandinavica. 2017; 59(1).
- Nagata, M. B., J. Egashira, N. Katafuchi, K. Endo, K. Ogata, K. Yamanaka, T. Yamanouchi, H. Matsuda, Y. Hashiyada y K. Yamashita. Bovine sperm selection procedure prior to cryopreservation for improvement of post-thawed semen quality and fertility. Journal of Animal Science and Biotechnology. 2019; 10(1): 91.
- Nani, J. P. y F. Peñagaricano. Whole-genome homozygosity mapping reveals candidate regions affecting bull fertility in US Holstein cattle. BMC Genomics. 2020; 21(1): 338.
- Nijs, M. y W. Ombelet. Cryopreservation of human sperm. Human Fertility. 2001; 4(3): 158-163.
- Nikitkina, E. V., N. V. Dementieva, Y. S. Shcherbakov, M. M. Atroshchenko, A. A. Kudinov, O. I. Samoylov, M. V. Pozovnikova, A. P. Dysin, A. A. Krutikova, A. A. Musidray, O. V. Mitrofanova, K. V. Plemyashov, D. K. Griffin y M. N. Romanov. Genome-wide association study for frozen-thawed sperm motility in stallions across various horse breeds. Animal Bioscience. 2022; 35(12): 1827-1838.
- Ntemka, A., G. Tsousis, C. Brozos, E. Kiossis, C. M. Boscós y I. A. Tsakmakidis. Breed differences of bull frozen-thawed semen. Reproduction in Domestic Animals. 2016; 51(6): 945-952.
- O'Brien, A., G. Mészáros, Y. Utsunomiya, T. Sonstegard, J. Garcia, C. Tassell, R. Carvalheiro, M. Silva y J. Sölkner. Linkage disequilibrium levels in *Bos indicus* and *Bos Taurus* cattle using medium and High density SNP chip data and different minor allele frequency distributions. Livestock Science. 2014; 166.
- O'Leary, N. A., M. W. Wright, J. R. Brister, S. Ciufu, D. Haddad, R. McVeigh, B. Rajput, B. Robbertse, B. Smith-White, D. Ako-Adjei, A. Astashyn, A. Badretdin, Y. Bao, O. Blinkova, V. Brover, V. Chetvernin, J. Choi, E. Cox, O. Ermolaeva, C. M. Farrell, T. Goldfarb, T. Gupta, D. Haft, E. Hatcher, W. Hlavina, V. S. Joardar, V. K. Kodali, W. Li, D. Maglott, P. Masterson, K. M. McGarvey, M. R. Murphy, K. O'Neill, S. Pujar, S. H. Rangwala, D. Rausch, L. D. Riddick, C. Schoch, A. Shkeda, S. S. Storz, H. Sun, F. Thibaud-Nissen, I. Tolstoy, R. E. Tully, A. R. Vatsan, C. Wallin, D. Webb, W. Wu, M. J. Landrum, A. Kimchi, T. Tatusova, M. DiCuccio, P. Kitts, T. D. Murphy y K. D. Pruitt. Reference sequence (RefSeq) database at NCBI: current status, taxonomic expansion, and functional annotation. Nucleic Acids Research. 2016; 44(D1): D733-745.

- Olds-Clarke, P. Sperm from tw32/+ mice: Capacitation is normal, but hyperactivation is premature and nonhyperactivated sperm are slow. *Developmental Biology*. 1989; 131(2): 475-482.
- Oliva, R. Protamines and male infertility. *Human Reproduction Update*. 2006; 12(4): 417-435.
- Ostermeier, G. C., G. A. Sargeant, B. S. Yandell, D. P. Evenson y J. J. Parrish. Relationship of bull fertility to sperm nuclear shape. *Journal of Andrology*. 2001; 22(4): 595-603.
- Özbek, M., M. Hitit, A. Kaya, F. D. Jousan y E. Memili. Sperm Functional Genome Associated With Bull Fertility. *Frontiers in veterinary science*. 2021; 8.
- Pardede, B. P., M. Agil, N. W. K. Karja, C. Sumantri, I. Supriatna y B. Purwantara. PRM1 Gene Expression and Its Protein Abundance in Frozen-Thawed Spermatozoa as Potential Fertility Markers in Breeding Bulls. *Vet Sci*. 2022; 9(3).
- Parland, S. M., J. F. Kearney, M. Rath y D. P. Berry. Inbreeding Effects on Milk Production, Calving Performance, Fertility, and Conformation in Irish Holstein-Friesians. *Journal of Dairy Science*. 2007; 90(9): 4411-4419.
- Pausch, H., H. Venhoranta, C. Wurmser, K. Hakala, T. Iso-Touru, A. Sironen, R. K. Vingborg, H. Lohi, L. Soderquist, R. Fries y M. Andersson. A frameshift mutation in ARMC3 is associated with a tail stump sperm defect in Swedish Red (*Bos taurus*) cattle. *BMC Genetics*. 2016; 17: 49.
- Pemberton, Trevor J., D. Absher, Marcus W. Feldman, Richard M. Myers, Noah A. Rosenberg y Jun Z. Li. Genomic Patterns of Homozygosity in Worldwide Human Populations. *The American Journal of Human Genetics*. 2012; 91(2): 275-292.
- Peña, A. I., L. L. Lugalde, M. Barrio, P. G. Herradón y L. A. Quintela. Effects of Equex from different sources on post-thaw survival, longevity and intracellular Ca²⁺ concentration of dog spermatozoa. *Theriogenology*. 2003; 59(8): 1725-1739.
- Peñagaricano, F., K. A. Weigel y H. Khatib. Genome-wide association study identifies candidate markers for bull fertility in Holstein dairy cattle. *Animal Genetics*. 2012; 43(s1): 65-71.
- Perdomo-González, D. I., N. Laseca, S. Demyda-Peyrás, M. Valera, I. Cervantes y A. Molina. Fine-tuning genomic and pedigree inbreeding rates in equine population with a deep and reliable stud book: the case of the Pura Raza Española horse. *Journal of Animal Science and Biotechnology*. 2022; 13(1): 127.
- Pereira, R. J., M. L. Santana Jr, D. R. Ayres, A. B. Bignardi, G. R. O. Menezes, L. O. C. Silva, C. H. C. Machado, L. A. Josahkian y L. G. Albuquerque. Inbreeding depression in Zebu cattle traits. *Journal of Animal Breeding and Genetics*. 2016; 133(6): 523-533.
- Peres Campanholi, S., S. Garcia Neto, A. C. Basso, J. D. de Agostini Losano, A. F. Perez Siqueira, M. Nichi, M. E. Ortiz D'Avila Assumpção, L. Afonso de Freitas, C. C. Paro de Paz, A. S. Ferraudo, F. Morato Monteiro y L. Unno Gimenes. Estimate of in vitro embryo production based on sperm subpopulations in Senepol bulls. *Theriogenology*. 2021; 161: 98-107.
- Perez, B. C., J. C. C. Balieiro, G. A. Oliveira Junior, L. T. Andrietta, R. G. Vizoná, R. V. Ventura, F. A. T. Bruneli y M. G. C. D. Peixoto. State of inbreeding and genetic trends for estimated breeding values in IVF embryos and oocyte donors in the Brazilian Guzerá cattle. *Theriogenology*. 2019; 125: 71-78.
- Peripolli, E., J. Metzger, M. V. A. de Lemos, N. B. Stafuzza, S. Kluska, B. F. Olivieri, F. L. B. Feitosa, M. P. Berton, F. B. Lopes, D. P. Munari, R. B. Lôbo, C. d. U. Magnabosco, F. Di Croce, J. Osterstock, S. Denise, A. S. C. Pereira y F. Baldi. Autozygosity islands and ROH patterns in Nellore lineages: evidence of selection for functionally important traits. *BMC Genomics*. 2018; 19(1): 680.
- Peripolli, E., D. P. Munari, M. V. G. B. Silva, A. L. F. Lima, R. Irgang y F. Baldi. Runs of homozygosity: current knowledge and applications in livestock. *Animal Genetics*. 2017; 48(3): 255-271.
- Peripolli, E., N. B. Stafuzza, D. P. Munari, A. L. F. Lima, R. Irgang, M. A. Machado, J. C. d. C. Panetto, R. V. Ventura, F. Baldi y M. V. G. B. da Silva. Assessment of runs of homozygosity islands and estimates of genomic inbreeding in Gyr (*Bos indicus*) dairy cattle. *BMC Genomics*. 2018; 19(1): 34.

- Peris-Frau, P., A. Martín-Maestro, M. Iniesta-Cuerda, I. Sánchez-Ajofrín, A. Cesari, J. J. Garde, M. Villar y A. J. Soler. Cryopreservation of ram sperm alters the dynamic changes associated with in vitro capacitation. *Theriogenology*. 2020; 145: 100-108.
- Pilon, B., K. Hinterneder, E. H. A. Hay y B. Fragomeni. Inbreeding Calculated with Runs of Homozygosity Suggests Chromosome-Specific Inbreeding Depression Regions in Line 1 Hereford. *Animals*. 2021; 11(11): 3105.
- Pinheiro, J., D. Bates, S. S. DebRoy y D. Sarkar. nlme: Linear and Nonlinear Mixed Effects Models. En: R package version 3.1-1102013. 3: 1-113.
- Pitnick, S. S., D. J. Hosken y T. R. Birkhead. Sperm morphological diversity. En: *Sperm Biology*, Elsevier. 2009: 69-149.
- Puglisi, R., G. Gaspa, D. Balduzzi, A. Severgnini, R. Vanni, N. Macciotta y A. Galli. Genomewide analysis of bull sperm quality and fertility traits. *Reproduction in Domestic Animals*. 2016; 51(5): 840-843.
- Purfield, D. C., D. P. Berry, S. McParland y D. G. Bradley. Runs of homozygosity and population history in cattle. *BMC Genetics*. 2012; 13(1): 70.
- Qin, C., H. Yin, X. Zhang, D. Sun, Q. Zhang, J. Liu, X. Ding, Y. Zhang y S. Zhang. Genome-wide association study for semen traits of the bulls in Chinese Holstein. *Animal Genetics*. 2017; 48(1): 80-84.
- Ramón, M., P. Jiménez-Rabadán, O. García-Álvarez, A. Maroto-Morales, A. J. Soler, M. R. Fernández-Santos, M. D. Pérez-Guzmán y J. J. Garde. Understanding sperm heterogeneity: Biological and practical implications. *Reproduction in Domestic Animals*. 2014; 49(s4): 30-36.
- Ramón, M. y F. Martínez-Pastor. Implementation of novel statistical procedures and other advanced approaches to improve analysis of CASA data. *Reproduction, Fertility and Development*. 2018; 30(6): 860-866.
- Ramón, M., A. J. Soler, J. A. Ortiz, O. García-Álvarez, A. Maroto-Morales, E. R. S. Roldan y J. J. Garde. Sperm population structure and male fertility: An intraspecific study of sperm design and velocity in Red Deer. *Biology of Reproduction*. 2013; 89(5).
- Rasul, Z., N. Ahmad y M. Anzar. Changes in Motion Characteristics, Plasma Membrane Integrity, and Acrosome Morphology During Cryopreservation of Buffalo Spermatozoa. *Journal of Andrology*. 2001; 22(2): 278-283.
- Renkawitz-Pohl, R., L. Hempel, M. Hollmann y M. A. Schäfer. Spermatogenesis. En: *Comprehensive molecular insect science*. L. I. Gilbert, K. Iatrou y S. S. Gill. Amsterdam; Boston, Elsevier. 2005: pp. 157-177.
- Riesco, M. F., L. Anel-Lopez, M. Neila-Montero, C. Palacin-Martinez, R. Montes-Garrido, M. Alvarez, P. de Paz y L. Anel. ProAKAP4 as Novel Molecular Marker of Sperm Quality in Ram: An Integrative Study in Fresh, Cooled and Cryopreserved Sperm. *Biomolecules*. 2020; 10(7): 1046.
- Roberts, J., T. Byrem y D. Grooms. Application of an ELISA Milk Pregnancy Test in Beef Cows. *Reproduction in Domestic Animals*. 2015; 50(4): 651-658.
- Roca, J., M. Hernández, G. Carvajal, J. M. Vázquez y E. A. Martínez. Factors influencing boar sperm cryosurvival. *Journal of Animal Science*. 2006; 84(10): 2692-2699.
- Rodero Serrano, E. y A. Molina Alcalá. La conservación de la diversidad de razas autóctonas de Andalucía, Junta de Andalucía, Sevilla, España, 2008.
- Roldan, E. R. S. Sperm competition and the evolution of sperm form and function in mammals. *Reproduction in Domestic Animals*. 2019; 54 Suppl 4: 14-21.
- Roldan, E. R. S. Assessments of sperm quality integrating morphology, swimming patterns, bioenergetics and cell signalling. *Theriogenology*. 2020; 150: 388-395.
- Rosen, B. D., D. M. Bickhart, R. D. Schnabel, S. Koren, C. G. Elsik, E. Tseng, T. N. Rowan, W. Y. Low, A. Zimin, C. Couldrey, R. Hall, W. Li, A. Rhie, J. Ghurye, S. D. McKay, F. Thibaud-Nissen, J. Hoffman, B. M. Murdoch, W. M. Snelling, T. G. McDaneld, J. A. Hammond, J. C. Schwartz, W. Nandolo, D. E. Hagen, C. Dreischer, S. J. Schultheiss, S. G. Schroeder, A. M. Phillippy, J. B. Cole, C. P.

- Van Tassell, G. Liu, T. P. L. Smith y J. F. Medrano. De novo assembly of the cattle reference genome with single-molecule sequencing. GigaScience. 2020; 9(3).
- Roth, Z., S. Asaf, O. Furman, Y. Lavon, D. Kalo, D. Wolfenson y G. Leitner. Subclinical mastitis disrupts oocyte cytoplasmic maturation in association with reduced developmental competence and impaired gene expression in preimplantation bovine embryos. Reproduction, Fertility and Development. 2016; 28(11): 1653-1662.
- Roth, Z., A. Dvir, D. Kalo, Y. Lavon, O. Krifucks, D. Wolfenson y G. Leitner. Naturally occurring mastitis disrupts developmental competence of bovine oocytes. Journal of Dairy Science. 2013; 96(10): 6499-6505.
- Rousseeuw, P. J. Silhouettes: A graphical aid to the interpretation and validation of cluster analysis. Journal of Computational and Applied Mathematics. 1987; 20: 53-65.
- Rubessa, M., M. E. Kandel, S. Schreiber, S. Meyers, D. H. Beck, G. Popescu y M. B. Wheeler. Morphometric analysis of sperm used for IVP by three different separation methods with spatial light interference microscopy. Systems Biology in Reproductive Medicine. 2020; 66(1): 26-36.
- Rubio-Guillén, J., D. González, J. J. Garde, M. C. Estes, M. R. Fernández-Santos, J. E. Rodríguez-Gil, N. Madrid-Bury y A. Quintero-Moreno. Effects of cryopreservation on bull spermatozoa distribution in morphometrically distinct subpopulations. Reproduction in Domestic Animals. 2007; 42(4): 354-357.
- Rurangwa, E., F. A. M. Volckaert, G. Huyskens, D. E. Kime y F. Ollevier. Quality control of refrigerated and cryopreserved semen using computer-assisted sperm analysis (CASA), viable staining and standardized fertilization in African catfish (*Clarias gariepinus*). Theriogenology. 2001; 55(3): 751-769.
- Sailer, B. L., L. K. Jost y D. P. Evenson. Bull sperm head morphometry related to abnormal chromatin structure and fertility. Cytometry. 1996; 24(2): 167-173.
- Salvador, S. y P. Chan. Determining the Number of Clusters/Segments in Hierarchical Clustering/Segmentation Algorithms, 2004.
- Sansegundo, E., M. Tourmente y E. R. S. Roldan. Energy Metabolism and Hyperactivation of Spermatozoa from Three Mouse Species under Capacitating Conditions. Cells. 2022; 11(2): 220.
- Santymire, R. M., E. V. Lonsdorf, C. M. Lynch, D. E. Wildt, P. E. Marinari, J. S. Kreeger y J. G. Howard. Inbreeding causes decreased seminal quality affecting pregnancy and litter size in the endangered black-footed ferret. Animal Conservation. 2019; 22(4): 331-340.
- Saura, M., A. Fernández, L. Varona, A. I. Fernández, M. Á. R. De Cara, C. Barragán y B. Villanueva. Detecting inbreeding depression for reproductive traits in Iberian pigs using genome-wide data. Genetics Selection Evolution. 2015; 47(1).
- Sayed, R. K. A., D. M. Mokhtar, M. Fernández-Ortiz, G. Escames y D. Acuña-Castroviejo. Retinoid-related orphan nuclear receptor alpha (ROR α)-deficient mice display morphological testicular defects. Laboratory Investigation. 2019; 99(12): 1835-1849.
- Sayed, R. K. A., D. M. Mokhtar, M. Fernandez-Ortiz, J. Fernandez-Martinez, P. Aranda-Martinez, G. Escames y D. Acuna-Castroviejo. Lack of retinoid acid receptor-related orphan receptor alpha accelerates and melatonin supplementation prevents testicular aging. Aging. 2020; 12(13): 12648-12668.
- Scientific, T. F. Axiom™ Analysis Suite v5.12020.
- Seo, H., Y. Choi, J. Shim, I. Yoo y H. Ka. Comprehensive Analysis of Prostaglandin Metabolic Enzyme Expression During Pregnancy and the Characterization of AKR1B1 as a Prostaglandin F Synthase at the Maternal-Conceptus Interface in Pigs1. Biology of Reproduction. 2014; 90(5).
- Sewalem, A., G. J. Kistemaker, F. Miglior y B. J. Van Doormaal. Analysis of inbreeding and its relationship with functional longevity in Canadian dairy cattle. Journal of Dairy Science. 2006; 89(6): 2210-2216.

- Sha, Y., X. Yang, L. Mei, Z. Ji, X. Wang, L. Ding, P. Li y S. Yang. *DNAH1* gene mutations and their potential association with dysplasia of the sperm fibrous sheath and infertility in the Han Chinese population. Fertility and Sterility. 2017; 107(6): 1312-1318.e1312.
- Sharma, A., J. S. Lee, C. G. Dang, P. Sudrajad, H. C. Kim, S. H. Yeon, H. S. Kang y S. H. Lee. Stories and Challenges of Genome Wide Association Studies in Livestock - A Review. Asian-Australas Journal of Animal Sciences. 2015; 28(10): 1371-1379.
- Sherman, B. T., M. Hao, J. Qiu, X. Jiao, M. W. Baseler, H. C. Lane, T. Imamichi y W. Chang. DAVID: a web server for functional enrichment analysis and functional annotation of gene lists (2021 update). Nucleic Acids Research. 2022; 50(W1): W216-w221.
- Shojaei Saadi, H. A., E. van Riemsdijk, A. L. Dance, G. D. Rajamanickam, J. P. Kastelic y J. C. Thundathil. Proteins associated with critical sperm functions and sperm head shape are differentially expressed in morphologically abnormal bovine sperm induced by scrotal insulation. Journal of Proteomics. 2013; 82: 64-80.
- Silió, L., M. C. Rodríguez, A. Fernández, C. Barragán, R. Benítez, C. Óvilo y A. I. Fernández. Measuring inbreeding and inbreeding depression on pig growth from pedigree or SNP-derived metrics. Journal of Animal Breeding and Genetics. 2013; 130(5): 349-360.
- Simmons, L. W. y J. L. Fitzpatrick. Sperm wars and the evolution of male fertility. REPRODUCTION. 2012; 144(5): 519-534.
- Smith, L. A., B. G. Cassell y R. E. Pearson. The Effects of Inbreeding on the Lifetime Performance of Dairy Cattle. Journal of Dairy Science. 1998; 81(10): 2729-2737.
- Smith, T. T. y R. Yanagimachi. Attachment and release of spermatozoa from the caudal isthmus of the hamster oviduct. J Reprod Fertil. 1991; 91(2): 567-573.
- Snowder, G. D., L. D. Van Vleck, L. V. Cundiff y G. L. Bennett. Influence of breed, heterozygosity, and disease incidence on estimates of variance components of respiratory disease in preweaned beef calves. Journal of Animal Science. 2005; 83(6): 1247-1261.
- Soler, C., A. Alambiaga, M. Martí, A. García-Molina, A. Valverde, J. Contell y M. Campos. Dog sperm head morphometry: its diversity and evolution. Asian journal of andrology. 2017; 19(2): 149-153.
- Soler, C., J. Contell, L. Bori, M. Sancho, A. García-Molina, A. Valverde y J. Segarvall. Sperm kinematic, head morphometric and kinetic-morphometric subpopulations in the blue fox (*Alopex lagopus*). Asian journal of andrology. 2017; 19(2): 154-159.
- Sosa-Madrid, B. S., M. A. Santacreu, A. Blasco, L. Fontanesi, R. N. Pena y N. Ibáñez-Escriche. A genomewide association study in divergently selected lines in rabbits reveals novel genomic regions associated with litter size traits. Journal of Animal Breeding and Genetics. 2020; 137(2): 123-138.
- Stachowicz, K., M. Sargolzaei, F. Miglior y F. S. Schenkel. Rates of inbreeding and genetic diversity in Canadian Holstein and Jersey cattle. Journal of Dairy Science. 2011; 94(10): 5160-5175.
- Stauss, C. R., T. J. Votta y S. S. Suarez. Sperm motility hyperactivation facilitates penetration of the hamster zona pellucida. Biology of Reproduction. 1995; 53(6): 1280-1285.
- Støstad, H. N., A. Johnsen, J. T. Lifjeld y M. Rowe. Sperm head morphology is associated with sperm swimming speed: A comparative study of songbirds using electron microscopy. Evolution. 2018; 72(9): 1918-1932.
- Suarez, S. S., D. F. Katz, D. H. Owen, J. B. Andrew y R. L. Powell. Evidence for the Function of Hyperactivated Motility in Sperm. Biology of Reproduction. 1991; 44(2): 375-381.
- Sun, Y., W. J. Zhang, X. Zhao, R. P. Yuan, H. Jiang y X. P. Pu. PARK7 protein translocating into spermatozoa mitochondria in Chinese asthenozoospermia. REPRODUCTION. 2014; 148(3): 249-257.
- Sweett, H., P. A. S. Fonseca, A. Suárez-Vega, A. Livernois, F. Miglior y A. Cánovas. Genome-wide association study to identify genomic regions and positional candidate genes associated with male fertility in beef cattle. Scientific Reports. 2020; 10(1): 20102.

- Szmatoła, T., A. Gurgul, K. Ropka-Molik, I. Jasielczuk, T. Ząbek y M. Bugno-Poniewierska. Characteristics of runs of homozygosity in selected cattle breeds maintained in Poland. Livestock Science. 2016; 188: 72-80.
- Szpiech, Zachary A., J. Xu, Trevor J. Pemberton, W. Peng, S. Zöllner, Noah A. Rosenberg y Jun Z. Li. Long Runs of Homozygosity Are Enriched for Deleterious Variation. The American Journal of Human Genetics. 2013; 93(1): 90-102.
- Terán, E., F. Azcona, M. Ramón, A. Molina, J. Dorado, M. Hidalgo, P. Ross, D. Goszczynski y S. Demyda-Peyrás. Sperm morphometry is affected by increased inbreeding in the Retinta cattle breed: A molecular approach. Mol Reprod Dev. 2021; 88(6): 416-426.
- Todd, E. T., N. A. Hamilton, B. D. Velie y P. C. Thomson. The effects of inbreeding on covering success, gestation length and foal sex ratio in Australian thoroughbred horses. BMC Genetics. 2020; 21(1): 41.
- Toro-Ospina, A. M., A. C. Herrera Rios, G. Pimenta Schettini, V. H. Vallejo Aristizabal, W. Bizarria dos Santos, C. A. Zapata y E. G. Ortiz Morea. Identification of Runs of Homozygosity Islands and Genomic Estimated Inbreeding Values in Caqueteño Creole Cattle (Colombia). Genes. 2022; 13(7): 1232.
- Tsai, P. S., N. Garcia-Gil, T. van Haeften y B. M. Gadella. How pig sperm prepares to fertilize: stable acrosome docking to the plasma membrane. PLOS ONE. 2010; 5(6): e11204.
- Turner, S. D. qqman: an R package for visualizing GWAS results using Q-Q and manhattan plots. bioRxiv. 2014: 005165.
- Underwood, S. L., R. Bathgate, D. C. Pereira, A. Castro, P. C. Thomson, W. M. Maxwell y G. Evans. Embryo production after in vitro fertilization with frozen-thawed, sex-sorted, re-frozen-thawed bull sperm. Theriogenology. 2010; 73(1): 97-102.
- Utsunomiya, Y. T., A. M. Pérez O'Brien, T. S. Sonstegard, C. P. Van Tassell, A. S. do Carmo, G. Mészáros, J. Sölkner y J. F. Garcia. Detecting Loci under Recent Positive Selection in Dairy and Beef Cattle by Combining Different Genome-Wide Scan Methods. PLOS ONE. 2013; 8(5): e64280.
- Valcarce, D. G., F. Cartón-García, M. P. Herráez y V. Robles. Effect of cryopreservation on human sperm messenger RNAs crucial for fertilization and early embryo development. Cryobiology. 2013; 67(1): 84-90.
- Valverde, A., V. Barquero y C. Soler. The application of computer-assisted semen analysis (CASA) technology to optimise semen evaluation. A review. Journal of Animal and Feed Sciences. 2020; 29(3): 189-198.
- van der Horst, G., L. Maree y S. S. du Plessis. Current perspectives of CASA applications in diverse mammalian spermatozoa. Reproduction, Fertility and Development. 2018; 30(6): 875-888.
- van Eldik, P., E. H. van der Waaij, B. Ducro, A. W. Kooper, T. A. Stout y B. Colenbrander. Possible negative effects of inbreeding on semen quality in Shetland pony stallions. Theriogenology. 2006; 65(6): 1159-1170.
- VanRaden, P. M. Efficient Methods to Compute Genomic Predictions. Journal of Dairy Science. 2008; 91(11): 4414-4423.
- Verardo, L. L., F. F. Silva, M. S. Lopes, O. Madsen, J. W. M. Bastiaansen, E. F. Knol, M. Kelly, L. Varona, P. S. Lopes y S. E. F. Guimarães. Revealing new candidate genes for reproductive traits in pigs: combining Bayesian GWAS and functional pathways. Genetics Selection Evolution. 2016; 48(1): 9.
- Verma, A., S. Rajput, S. Kumar, S. De, A. K. Chakravarty, R. Kumar y T. K. Datta. Differential Histone Modification Status of Spermatozoa in Relation to Fertility of Buffalo Bulls. Journal of Cellular Biochemistry. 2015; 116(5): 743-753.
- Vervloessem, T., D. I. Yule, G. Bultynck y J. B. Parys. The type 2 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor, emerging functions for an intriguing Ca²⁺-release channel. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research. 2015; 1853(9): 1992-2005.

- Vervloessem, T., D. I. Yule, G. Bultynck y J. B. Parys. The type 2 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor, emerging functions for an intriguing Ca²⁺-release channel. Biochimica et Biophysica Acta. 2015; 1853(9): 1992-2005.
- Vicente-Fiel, S., I. Palacín, P. Santolaria, C. O. Hidalgo, M. A. Silvestre, F. Arrebola y J. L. Yániz. A comparative study of the sperm nuclear morphometry in cattle, goat, sheep, and pigs using a new computer-assisted method (CASMA-F). Theriogenology. 2013; 79(3): 436-442.
- Villa-Angulo, R., L. K. Matukumalli, C. A. Gill, J. Choi, C. P. Van Tassell y J. J. Grefenstette. High-resolution haplotype block structure in the cattle genome. BMC Genetics. 2009; 10(1): 19.
- Vincent, P., S. L. Underwood, C. Dolbec, N. Bouchard, T. Kroetsch y P. Blondin. Bovine Semen Quality Control in Artificial Insemination Centers. En: Bovine Reproduction 2014: 685-695.
- Visconti, P. E. Sperm Bioenergetics in a Nutshell. Biology of Reproduction. 2012; 87(3): 1-4.
- Walensky, L. D. y S. H. Snyder. Inositol 1,4,5-trisphosphate receptors selectively localized to the acrosomes of mammalian sperm. Journal of Cell Biology. 1995; 130(4): 857-869.
- Walensky, L. D. y S. H. Snyder. Inositol 1,4,5-trisphosphate receptors selectively localized to the acrosomes of mammalian sperm. Journal of Cell Biology. 1995; 130(4): 857-869.
- Wang, J., J. Wang, M. Wang, R. Hong, S. Tang, Y. Xu, X. Zhao, T. Zhou, Z. Wang y S. Huang. Quantitative phosphoproteomics reveals GSK3A substrate network is involved in the cryodamage of sperm motility. Bioscience Reports. 2021; 41(10).
- Wang, X., J. Y. Kang, L. Wei, X. Yang, H. Sun, S. Yang, L. Lu, M. Yan, M. Bai, Y. Chen, J. Long, N. Li, D. Li, J. Huang, M. Lei, Z. Shao, W. Yuan, E. Zuo, K. Lu, M. F. Liu y J. Li. PHF7 is a novel histone H2A E3 ligase prior to histone-to-protamine exchange during spermiogenesis. Development. 2019; 146(13).
- Wang, Y., Y. Sun, X. Zhao, R. Yuan, H. Jiang y X. Pu. Downregulation of DJ-1 Fails to Protect Mitochondrial Complex I Subunit NDUFS3 in the Testes and Contributes to the Asthenozoospermia. Mediators Inflamm. 2018; 2018: 6136075.
- Weir, B. S., P. J. Avery y W. G. Hill. Effect of mating structure on variation in inbreeding. Theoretical Population Biology. 1980; 18(3): 396-429.
- Wickham, H., M. Averick, J. Bryan, W. Chang, L. D. A. McGowan, R. François, G. Golemund, A. Hayes, L. Henry, J. Hester, M. Kuhn, T. L. Pedersen, E. M. Stephan, M. Bache, K. Müller, J. Ooms, D. Robinson, D. P. Seidel, V. Spinu, K. Takahashi, D. Vaughan, C. Wilke, K. Woo y H. Yutani. Welcome to the "tidyverse". Journal of Open Source Software. 2019; 4(43): 1686.
- Williams, J. L., S. J. Hall, M. Del Corvo, K. T. Ballingall, L. Colli, P. Ajmone Marsan y F. Biscarini. Inbreeding and purging at the genomic Level: the Chillingham cattle reveal extensive, non-random SNP heterozygosity. Animal Genetics. 2016; 47(1): 19-27.
- Won, J., C. M. de Evsikova, R. S. Smith, W. L. Hicks, M. M. Edwards, C. Longo-Guess, T. Li, J. K. Naggert y P. M. Nishina. NPHP4 is necessary for normal photoreceptor ribbon synapse maintenance and outer segment formation, and for sperm development. Human Molecular Genetics. 2010; 20(3): 482-496.
- Wright, S. Coefficients of Inbreeding and Relationship. The American Naturalist. 1922; 56(645): 330-338.
- Wright, S. Genetics of populations. Encyclopedia Britannica. 1948; 10: 111-112.
- Yamaji, M., Y. Seki, K. Kurimoto, Y. Yabuta, M. Yuasa, M. Shigeta, K. Yamanaka, Y. Ohinata y M. Saitou. Critical function of Prdm14 for the establishment of the germ cell lineage in mice. Nature genetics. 2008; 40(8): 1016-1022.
- Yanagimachi, R. The movement of golden hamster spermatozoa before and after capacitation. J Reprod Fertil. 1970; 23(1): 193-196.
- Yang, J., S. H. Lee, M. E. Goddard y P. M. Visscher. GCTA: a tool for genome-wide complex trait analysis. Am J Hum Genet. 2011; 88(1): 76-82.
- Yániz, J. L., I. Palacín, S. Vicente-Fiel, J. A. Sánchez-Nadal y P. Santolaria. Sperm population structure in high and low field fertility rams. Animal Reproduction Science. 2015; 156: 128-134.

- Yániz, J. L., C. Soler, C. Alquézar-Baeta y P. Santolaria. Toward an integrative and predictive sperm quality analysis in *Bos taurus*. Animal Reproduction Science. 2017; 181: 108-114.
- Yániz, J. L., C. Soler y P. Santolaria. Computer assisted sperm morphometry in mammals: A review. Animal Reproduction Science. 2015; 156: 1-12.
- Yao, C., Q. Yuan, M. Niu, H. Fu, F. Zhou, W. Zhang, H. Wang, L. Wen, L. Wu, Z. Li y Z. He. Distinct Expression Profiles and Novel Targets of MicroRNAs in Human Spermatogonia, Pachytene Spermatocytes, and Round Spermatids between OA Patients and NOA Patients. Molecular therapy. Nucleic acids. 2017; 9: 182-194.
- Yeste, M., S. Bonet, J. E. Rodríguez-Gil y M. M. Rivera Del Álamo. Evaluation of sperm motility with CASA-Mot: which factors may influence our measurements? Reproduction, Fertility and Development. 2018; 30(6): 789-798.
- Zavarez, L. B., Y. T. Utsunomiya, A. S. Carmo, H. H. R. Neves, R. Carvalheiro, M. Ferenčaković, A. M. Pérez O'Brien, I. Curik, J. B. Cole, C. P. Van Tassell, M. V. G. B. da Silva, T. S. Sonstegard, J. Sölkner y J. F. Garcia. Assessment of autozygosity in Nellore cows (*Bos indicus*) through high-density SNP genotypes. Frontiers in Genetics. 2015; 6(5).
- Zhang, H., J.-Q. Yu, L.-L. Yang, L. M. Kramer, X.-Y. Zhang, W. Na, J. M. Reecy y H. Li. Identification of genome-wide SNP-SNP interactions associated with important traits in chicken. BMC Genomics. 2017; 18(1): 892.
- Zhang, L., M. S. Orloff, S. Reber, S. Li, Y. Zhao y C. Eng. cgaTOH: Extended Approach for Identifying Tracts of Homozygosity. PLOS ONE. 2013; 8(3): e57772.
- Zhang, Q., M. P. L. Calus, B. Guldbbrandtsen, M. S. Lund y G. Sahana. Estimation of inbreeding using pedigree, 50k SNP chip genotypes and full sequence data in three cattle breeds. BMC Genetics. 2015; 16(1): 88.
- Zhang, Q., B. Guldbbrandtsen, M. Bosse, M. S. Lund y G. Sahana. Runs of homozygosity and distribution of functional variants in the cattle genome. BMC Genomics. 2015; 16(1): 542.
- Ziegler, T. E., A. Molina, M. Ramón, M. Sanchez, E. Muñoz-Mejías, A. Antonini y S. Demyda-Peyrás. Analysis of the genomic landscape of inbreeding in two divergent groups of Spanish Florida goats. Journal of Animal Breeding and Genetics. 2023; 140(3): 316-329.
- Zoli, A., J.-F. Beckers, P. Wouters-Ballman, J. Closset, P. Falmagne y F. Ectors. Purification and Characterization of a Bovine Pregnancy-Associated Glycoprotein1. Biology of Reproduction. 1991; 45: 1-10.

Material suplementario

Material suplementario del capítulo 1

Tabla Suplementaria 1. Parámetros para identificar ROH por cromosoma con diferentes longitudes mínimas. Cr: cromosoma; L: número mínimo de SNP's; nH: número de genotipos heterocigotos permitidos por ROH; nM: número de genotipos faltantes permitidos por ROH.

Cr	L	nH> 1Mb	nM> 1Mb	nH>2 Mb	nM> 2Mb	nH> 4Mb	nM> 4Mb	nH> 8Mb	nM> 8Mb	nH> 16Mb	nM> 16Mb
BTA1	83	1	1	1	2	2	5	5	10	10	19
BTA2	81	1	1	1	2	2	5	5	9	10	18
BTA3	77	1	1	1	2	2	4	5	8	9	16
BTA4	78	1	1	1	2	3	5	5	10	10	19
BTA5	76	1	1	1	2	2	4	4	8	9	16
BTA6	74	1	1	1	2	2	5	5	10	9	19
BTA7	76	1	1	1	2	2	4	5	9	9	18
BTA8	81	1	1	1	2	2	4	5	8	10	17
BTA9	79	1	1	1	2	3	5	5	9	10	18
BTA10	79	1	1	1	2	3	4	5	9	11	18
BTA11	83	1	1	1	2	2	4	5	8	10	17
BTA12	77	1	1	1	2	2	5	5	9	10	19
BTA13	83	1	1	1	2	2	4	5	7	9	14
BTA14	81	1	1	1	2	2	4	4	7	9	15
BTA15	76	1	1	1	2	3	5	5	9	10	18
BTA16	74	1	1	1	2	2	5	5	9	10	18
BTA17	78	1	1	1	2	2	4	5	8	9	17
BTA18	75	1	1	1	2	2	4	5	7	9	14
BTA19	88	1	1	1	2	2	3	4	7	8	14
BTA20	71	1	1	1	2	3	5	5	10	10	19
BTA21	76	1	1	1	2	3	5	5	9	10	18
BTA22	77	1	1	1	2	2	4	5	8	10	16
BTA23	70	1	2	2	3	3	6	7	12	13	24
BTA24	77	1	1	1	2	3	5	5	10	11	19
BTA25	71	1	1	1	2	3	4	5	8	11	16
BTA26	76	1	1	1	2	3	5	6	9	12	18
BTA27	74	1	1	2	2	3	5	6	10	13	20
BTA28	71	1	1	1	3	3	5	6	10	12	21
BTA29	75	1	1	1	2	3	5	5	9	11	19

Tabla suplementaria 2. Estadística descriptiva de la longitud del ROH (pb) en toros altamente endogámicos (AE) y de baja endogamia (BE).

Grupo AE					Grupo BE				
Muestra	Promedio	D.E.	Mínimo	Máximo	Muestra	Promedio	D.E.	Mínimo	Máximo
A1	5482497,04	7094776,71	1008605	51517368	B1	2227440,89	2623076,59	1012304	13003341
A2	3507576,81	4849770,09	1015043	41160383	B2	2742210,82	4271606,07	1018344	23218411
A3	4107950,65	4744855,28	1011434	26418452	B3	2030743,37	2002657,11	1007543	10449334
A4	6706719	10432050,8	1004731	66879696	B4	1389561,5	364982,637	1001637	2208308
A5	2901444,77	3334005,7	1010904	23663651	B5	1439538,79	475330,236	1009093	2752330
A6	4732450,53	5390462,68	1022652	24888481	B6	1731402,11	640049,969	1054930	3643544
A7	1756420,13	1066275,53	1002917	8511881	B7	2195795,57	2084729,09	1008736	8234592
A8	1732185,62	883397,665	1003249	5509317	B8	3012304,93	5054517,08	1056652	26970647
A9	3111560,68	3809878,47	1009918	19271881	B9	4741477,78	9499514,12	1011388	56725707
A10	1917219,68	1401528,6	1016036	10348113	B10	1330967,08	301664,126	1029134	2108767
A11	3053240,67	3115509,54	1017277	20812219	B11	1990337,09	2044519,94	1005545	10363653
A12	6204957,18	9647749,75	1017653	54013799	B12	1352846,18	437324,729	1002746	2267918
A13	2597737,07	2938169,47	1007154	25169525	B13	1951438,72	1727459,6	1007241	11295869
A14	1479117,86	628323,577	1000831	4714209	B14	1507382,07	697913,42	1002496	4357361
A15	3786539,98	5447906,24	1006403	37449008	B15	1600610,51	962059,541	1010620	7074658
A16	5283428,74	6889048,85	1038592	31362006	B16	2802283,64	3041891,19	1013470	18104694
A17	6099787,42	9066698,1	1005183	43916167	B17	2724496,07	3021514,18	1002066	21567567
A18	2058350,89	2361346,01	1012818	25213707	B18	1773197,34	1205980,75	1005410	9493902
A19	4150750,65	5407313,08	1004073	42816922	B19	1985803,17	1654132,48	1018561	9166594
A20	2441153,72	2652245,09	1012295	18732993	B20	1934916,19	1760128,25	1001323	13890415
A21	3877864,85	4630175,07	1000875	28889503	B21	1491033,17	529609,876	1014478	2764318
A22	5210362,16	6434505,18	1026464	26523878	B22	4003311,11	4746368,69	1012304	26901656
A23	3634251,35	4018045,16	1014422	23276421					
A24	2281131,99	1948470,02	1022287	11487610					
A25	4537797,65	6032812,99	1008425	31579669					

A26	4573462,04	5601122,35	1021285	31279924
A27	4806631,13	7095256,55	1000236	41658876
A28	2573482,38	2282433,58	1003866	16228369
A29	5050236,08	7914195,51	1028169	47637106
A30	2271225,77	1795635,09	1001829	10898496
A31	3270703,74	3493101,91	1003242	24639985
A32	4661602,04	5459788,64	1024475	35357745

Tabla suplementaria 3. Estadística descriptiva de la longitud de ROH por cromosoma y grupo

Cromosoma	Grupo AE				Grupo BE			
	Promedio	D.E.	Máximo	Mínimo	Promedio	D.E.	Máximo	Mínimo
BTA1	2985576,46	3771799,63	29537007	1008620	1721031,89	928171,33	4579708	1001323
BTA2	3820407,46	6406720,56	54013799	1008425	2236382,96	2878441,37	21567567	1018561
BTA3	3863936,01	5684167,57	31579669	1024329	2498191,21	3009305,19	16166511	1007241
BTA4	3330402,12	4868889,47	37449008	1015789	1576678,33	560889,17	2846134	1028852
BTA5	3325258,37	4493306,58	33906524	1000899	2323812,01	3338137,49	26970647	1005410
BTA6	3374571,88	5200578,45	41658876	1008659	2219901,76	3338674,73	23218411	1005497
BTA7	3538747,50	5379944,71	44611735	1008605	1651904,51	822811,93	5184956	1009093
BTA8	3350149,80	5810942,30	66879696	1000236	1688105,68	1103813,20	5294061	1014478
BTA9	3952836,43	6049738,88	51517368	1007639	2487777,02	2363319,77	11589181	1008910
BTA10	3478873,92	4331302,31	22386497	1011210	1854761,61	1873378,53	11295869	1022144
BTA11	3497975,78	4601733,04	25213707	1018322	4115025,44	9265841,08	56725707	1002066
BTA12	3401906,68	4386214,80	37879837	1001829	2929461,13	3837257,34	22197815	1001913
BTA13	4767056,63	6914243,97	43916167	1009918	2136562,06	2397019,01	13890415	1017640
BTA14	4702572,24	5943878,62	30663523	1016413	3029252,73	4579787,76	26901656	1002496
BTA15	3515761,42	4172082,73	25720047	1006294	2429946,71	2407389,02	8329337	1017065
BTA16	2556440,42	3394182,73	24967019	1002258	1692716,37	924513,68	4671945	1005545
BTA17	3505541,52	5085834,06	41887440	1000875	1683669,82	1470194,67	6070409	1009875
BTA18	3802326,45	5374779,53	31350096	1017443	1491616,86	526081,08	2818781	1020625
BTA19	2591567,00	2896306,42	24359948	1004073	1774665,96	965721,33	5538139	1029134
BTA20	3357549,33	4089433,87	22923340	1012382	1268428,00	252034,35	1670826	1006588
BTA21	2643216,06	3021762,19	22875275	1003242	2268541,76	2583076,05	14453656	1001637
BTA22	5400697,57	7281702,18	34480498	1016036	2137703,45	2097357,36	10449334	1029430
BTA23	3324542,74	3676219,89	16451909	1000831	2505763,21	2640889,46	9712899	1002746
BTA24	4626856,07	5836505,09	32463608	1045990	1632386,94	637443,08	3786582	1127455
BTA25	3563112,46	6095957,06	42816922	1012818	1823416,74	866212,61	4357361	1035901
BTA26	3160419,13	2670259,35	12253536	1063533	3603724,42	2935442,12	9680528	1147816
BTA27	2629314,80	4284907,93	35357745	1003866	1874270,95	1136808,93	5931324	1022394
BTA28	3404495,98	3769016,36	18868224	1015987	1979863,08	1638566,50	5635389	1093694
BTA29	2981186,33	3333016,43	15282909	1006403	1832371,52	956434,86	4639325	1051461

Tabla suplementaria 4. Correlación entre la tasa de recombinación y la abundancia de ROH por cromosoma.

Cromosoma	ROH Total			ROH > 8Mb		
	Población total	AE	BE	Población total	AE	BE
BTA1	-0,0293	-0,0073	-0,0571	0,0067	0,0067	NA
BTA2	-0,0560	-0,0522	-0,0199	0,0497	-0,0481	-0,0177
BTA3	-0,0138	-0,0279	0,0093	0,0068	-0,0119	0,0505
BTA4	-0,0329	-0,0336	0,0032	-0,0607	-0,0607	NA
BTA5	-0,0491	-0,0630	-0,0008	-0,0112	-0,0404	0,0671
BTA6	0,0309	0,0542	-0,0626	0,0000	-0,0002	-0,0093
BTA7	-0,0681	-0,0816	-0,0307	-0,0539	-0,0540	NA
BTA8	-0,0541	-0,0370	-0,0704	0,0522	0,0522	NA
BTA9	-0,0607	-0,0553	-0,0527	-0,0484	-0,0522	0,0136
BTA10	-0,0431	-0,0324	-0,0667	0,0177	0,0211	0,0149
BTA11	-0,0013	0,0083	-0,0196	0,0325	0,0341	-0,0138
BTA12	0,0942	0,0897	0,0067	0,1214	0,1328	0,0136
BTA13	0,0018	0,0257	-0,0592	0,0061	0,0293	-0,0976
BTA14	-0,1126	-0,0858	-0,1163	-0,0951	-0,0733	-0,0966
BTA15	0,0061	-0,0028	-0,0009	0,0568	0,0701	-0,0400
BTA16	-0,0146	-0,0264	0,0271	-0,1070	-0,1070	NA
BTA17	0,0234	0,0448	-0,0920	0,0289	0,0289	NA
BTA18	0,0256	0,0353	-0,0425	0,0945	0,0945	NA
BTA19	0,0286	0,0825	-0,1435	0,0109	0,0109	NA
BTA20	-0,0439	-0,0341	-0,0342	-0,0565	-0,0565	NA
BTA21	-0,0618	-0,0272	-0,0806	-0,0835	-0,0749	-0,0371
BTA22	-0,0499	-0,0648	0,0124	-0,0540	-0,0604	0,0409
BTA23	0,1085	0,0874	0,0063	0,1552	0,1342	0,0774
BTA24	-0,0055	0,0014	-0,0570	-0,0042	-0,0042	NA
BTA25	0,0577	0,0563	0,0316	0,0941	0,0941	NA
BTA26	0,0174	-0,0211	0,0819	0,0413	0,0254	0,0845
BTA27	-0,0299	-0,0246	-0,0372	-0,0264	-0,0264	NA
BTA28	0,0995	0,1089	0,0461	0,1682	0,1682	NA
BTA29	-0,0616	-0,0223	-0,0851	0,0059	0,0059	NA

Los datos se analizaron por cromosoma en toda la población (PT), así como en AE y BE por separado,

utilizando la abundancia de ROH de cualquier longitud o ROH>8Mb. Correlación de Spearman. Las

correlaciones se estimaron por SNP dentro del cromosoma.

Material suplementario del capítulo 2

Tabla suplementaria 1. Parámetros para identificar ROH por categoría de longitud

Longitud de ROH	MinSNP	MaxGap	Het	<i>Missing</i>
1-2 Mb	20	1 Mb	1	1
2-4 Mb	20	1 Mb	1	2
4-8Mb	20	1 Mb	2	5
8-16 Mb	20	1 Mb	5	9
>16 Mb	20	1 Mb	10	18

Min SNP: mínimo número de SNP por ROH

MaxGap: máxima distancia permitida entre dos SNP consecutivos por ROH

Het: número de genotipos heterocigotos permitidos por ROH

Missing: número de genotipos faltantes permitidos por ROH

Tabla suplementaria 2. Intervalos genómicos diferencialmente afectados por la endogamia

Intervalo	Cromosoma	Inicio	Fin	Ancho	SNP's	p promedio	p mínimo	p máximo
Intervalo-1	BTA1	37824102	41533247	3709146	833	0,01268924	0,005096	0,033487
Intervalo-2	BTA6	56402475	56727092	324618	56	0,01364118	0,013363	0,01392
Intervalo-3	BTA6	62575605	63190024	614420	142	0,01377161	0,013375	0,033079
Intervalo-4	BTA6	76884188	76885239	1052	1	0,013578	0,013578	0,013578
Intervalo-5	BTA11	53747829	53762517	14689	3	0,01359767	0,01356	0,013643
Intervalo-6	BTA11	56391562	58222877	1831316	348	0,00417653	0,001115	0,0139
Intervalo-7	BTA11	83666565	83910870	244306	69	0,01364112	0,013376	0,01395
Intervalo-8	BTA12	76528110	76680987	152878	5	0,0069784	0,005275	0,013558
Intervalo-9	BTA13	4867102	6995444	2128343	643	0,00903882	0,002413	0,033053
Intervalo-10	BTA 13	9598042	10139206	541165	201	0,01372673	0,013292	0,033092
Intervalo-11	BTA 13	19436418	19839059	402642	138	0,0137878	0,01337	0,033046
Intervalo-12	BTA 13	22769773	28236045	5466273	1357	0,01402022	0,005109	0,033369
Intervalo-13	BTA 14	3862036	5688479	1826444	342	0,02091981	0,013283	0,033528
Intervalo-14	BTA 16	44651168	45705292	1054125	107	0,00103237	0,000181	0,002661
Intervalo-15	BTA 16	45936742	45988251	51510	11	0,00796173	0,001191	0,01375
Intervalo-16	BTA 17	19931299	21353539	1422241	308	0,01130896	0,005114	0,03319
Intervalo-17	BTA 18	7302665	7384959	82295	21	0,01367457	0,013368	0,013966
Intervalo-18	BTA 18	8438714	9447570	1008857	365	0,00571107	0,002514	0,013844
Intervalo-19	BTA 19	11887920	12242221	354302	103	0,01365282	0,013355	0,013914
Intervalo-20	BTA 22	44412647	46199984	1787338	441	0,02145624	0,013236	0,082341
Intervalo-21	BTA 22	47246440	49433330	2186891	501	0,013718	0,013289	0,032956
Intervalo-22	BTA 23	6227884	8728552	2500669	606	0,01314022	0,005223	0,033034
Intervalo-23	BTA 29	6792179	8127288	1335110	449	0,01251657	0,005171	0,03276

Intervalo: regiones genómicas significativamente afectadas por la endogamia; **inicio, fin y ancho** son expresados en pb; **SNP's:** cantidad de marcadores SNP dentro del intervalo; **p (mínimo, máximo y promedio):** fueron calculados teniendo en cuenta los valores p individuales de todos los SNPs localizados dentro de cada intervalo.

Tabla suplementaria 3. Genes diferencialmente afectados por la endogamia

Índice	Gen	Cromosoma	Inicio	Fin	Ancho	SNPs	p promedio
1	<i>NSUN3</i>	BTA1	38360629	38420857	60229	16	0,013654
2	<i>STX19</i>	BTA1	38315109	38331093	15985	8	0,013664
3	<i>ARL13B</i>	BTA1	38275547	38353321	77775	29	0,021635
4	<i>EPHA6</i>	BTA1	40974249	41996479	1022231	276	0,026577
5	<i>PROS1</i>	BTA1	38203318	38267163	63846	16	0,032932
6	<i>NWD2</i>	BTA6	56603723	56734199	130477	28	0,013635
7	<i>KCTD8</i>	BTA6	62834653	63097599	262947	67	0,01393
8	<i>ADGRL3</i>	BTA6	76716306	77658770	942465	114	0,091469
9	<i>REG3A</i>	BTA11	56716800	56719619	2820	1	0,001186
10	<i>REG3G</i>	BTA11	56606755	56609713	2959	1	0,002501
11	<i>FAM84A</i>	BTA11	83670822	83676255	5434	2	0,013677
12	<i>CLYBL</i>	BTA12	76430699	76628229	197531	6	0,008094
13	<i>MSRB2</i>	BTA13	24116088	24140974	24887	4	0,005311
14	<i>PIP4K2A</i>	BTA13	23621605	23808162	186558	34	0,005315
15	<i>ARMC3</i>	BTA13	23964717	24057072	92356	19	0,005344
16	<i>C13H10orf67</i>	BTA13	24215918	24271700	55783	14	0,005344
17	<i>OTUD1</i>	BTA13	24387754	24390638	2885	1	0,005404
18	<i>THNSL1</i>	BTA13	25844116	25858781	14666	1	0,005431
19	<i>SPAG6</i>	BTA13	23455035	23517702	62668	11	0,006103
20	<i>ENKUR</i>	BTA13	25807989	25844261	36273	21	0,006948
21	<i>GPR158</i>	BTA13	25713069	26260260	547192	150	0,011603
22	<i>KIAA1217</i>	BTA13	24591905	25412646	820742	221	0,012182
23	<i>SEPHS1</i>	BTA13	28008020	28034343	26324	16	0,013607
24	<i>NRP1</i>	BTA13	19633437	19782189	148753	58	0,013622
25	<i>ISM1</i>	BTA13	6817182	6909121	91940	23	0,013633
26	<i>DNAJC1</i>	BTA13	22968670	23148828	180159	18	0,013634
27	<i>COMMD3</i>	BTA13	23425884	23429678	3795	1	0,013642
28	<i>FZD8</i>	BTA13	26784524	26788085	3562	2	0,013646
29	<i>BMI1</i>	BTA13	23430480	23441040	10561	4	0,013647
30	<i>GJD4</i>	BTA13	26756928	26760409	3482	1	0,013648
31	<i>BEND7</i>	BTA13	28141625	28228467	86843	24	0,013656
32	<i>MYO3A</i>	BTA13	26491747	26661527	169781	42	0,013665
33	<i>MCM10</i>	BTA13	27854539	27891323	36785	9	0,013669
34	<i>GAD2</i>	BTA13	26666170	26728037	61868	15	0,013673
35	<i>PHYH</i>	BTA13	27975606	27996313	20708	4	0,013744
36	<i>SPTLC3</i>	BTA13	6599446	6751436	151991	55	0,014019
37	<i>MLLT10</i>	BTA13	22747499	22955685	208187	50	0,015975
38	<i>OPTN</i>	BTA13	27800737	27841110	40374	20	0,026233

39	<i>TASP1</i>	BTA13	6933390	7250930	317541	86	0,029257
40	<i>PRTFDC1</i>	BTA13	25673135	25775833	102699	35	0,030743
41	<i>ARHGAP21</i>	BTA13	25462884	25592959	130076	40	0.032971
42	<i>MACROD2</i>	BTA13	7552581	9879015	2326435	671	0.037175
43	<i>KIF16B</i>	BTA13	10070015	10377530	307516	78	0,075091
44	<i>FAM135B</i>	BTA14	4387975	4651873	263899	28	0.013659
45	<i>COL22A1</i>	BTA14	4095051	4319199	224149	35	0,032921
46	<i>SLC45A1</i>	BTA16	45035441	45057607	22167	1	0,000657
47	<i>VAMP3</i>	BTA16	45607169	45616702	9534	5	0,000679
48	<i>PER3</i>	BTA16	45533849	45602488	68640	9	0,000681
49	<i>ERRFI1</i>	BTA16	45352249	45366512	14264	4	0,000681
50	<i>TNFRSF9</i>	BTA16	45439420	45457708	18289	1	0,000684
51	<i>UTS2</i>	BTA16	45523912	45530515	6604	1	0,000696
52	<i>PARK7</i>	BTA16	45400216	45417097	16882	2	0,000698
53	<i>RERE</i>	BTA16	44615890	45030951	415062	35	0,0064
54	<i>CAMTA1</i>	BTA16	45618310	46612359	994050	153	0,118927
55	<i>PCDH18</i>	BTA17	20287884	20302108	14225	2	0,0137
56	<i>HSD17B2</i>	BTA18	8586156	8679914	93759	33	0,005313
57	<i>SDR42E1</i>	BTA18	8543653	8588257	44605	18	0,005342
58	<i>MPHOSPH6</i>	BTA18	8717274	8729011	11738	1	0.005363
59	<i>DYNLRB2</i>	BTA18	7325774	7335889	10116	6	0,013756
60	<i>CDH13</i>	BTA18	9138128	10154233	1016106	394	0,048352
61	<i>PLCG2</i>	BTA18	8313675	8471052	157378	33	0,060544
62	<i>BCAS3</i>	BTA19	11699712	12286154	586443	195	0,022459
63	<i>GNL3</i>	BTA22	48169495	48176059	6565	1	0,013486
64	<i>GLYCTK</i>	BTA22	48589691	48595083	5393	2	0,013552
65	<i>TKT</i>	BTA22	47707320	47730815	23496	3	0,013576
66	<i>IQCF2</i>	BTA22	49024698	49065832	41135	1	0,013579
67	<i>ITIH4</i>	BTA22	48057333	48075272	17940	4	0,0136
68	<i>BAP1</i>	BTA22	48479278	48487703	8426	1	0,013603
69	<i>DCAF1</i>	BTA22	49282339	49371088	88750	5	0,01361
70	<i>SMIM4</i>	BTA22	48286484	48289704	3221	1	0,013613
71	<i>PBRM1</i>	BTA22	48176056	48283003	106948	25	0,013613
72	<i>GLT8D1</i>	BTA22	48157167	48169414	12248	4	0,013618
73	<i>ITIH3</i>	BTA22	48078022	48091969	13948	5	0,01362
74	<i>POC1A</i>	BTA22	48705397	48806597	101201	20	0,013626
75	<i>ACY1</i>	BTA22	48948289	48953409	5121	2	0,013628
76	<i>NISCH</i>	BTA22	48370594	48432825	62232	14	0,013639
77	<i>STAB1</i>	BTA22	48343000	48368471	25472	5	0,013642
78	<i>RAD54L2</i>	BTA22	49168479	49255661	87183	18	0,013643
79	<i>RFT1</i>	BTA22	47812817	47861213	48397	15	0,013644

80	<i>SFMBT1</i>	BTA22	47876881	47997833	120953	48	0,013651
81	<i>ITIH1</i>	BTA22	48099217	48114411	15195	7	0,013653
82	<i>WNT5A</i>	BTA22	45540765	45561515	20751	3	0,013656
83	<i>DNAH1</i>	BTA22	48488236	48585159	96924	20	0,013657
84	<i>PRKCD</i>	BTA22	47746199	47780548	34350	5	0,01366
85	<i>PHF7</i>	BTA22	48466107	48479037	12931	3	0,013661
86	<i>TMEM110</i>	BTA22	48000251	48054406	54156	16	0.013668
87	<i>NEK4</i>	BTA22	48124581	48152516	27936	8	0,013673
88	<i>SEMA3G</i>	BTA22	48445721	48457031	11311	2	0,013682
89	<i>WDR82</i>	BTA22	48629513	48648119	18607	1	0,013689
90	<i>TEX264</i>	BTA22	49131857	49162133	30277	1	0,013699
91	<i>DUSP7</i>	BTA22	48825120	48832346	7227	1	0,013703
92	<i>NT5DC2</i>	BTA22	48291608	48343085	51478	4	0,013704
93	<i>ALAS1</i>	BTA22	48689688	48703752	14065	1	0,013706
94	<i>RPL29</i>	BTA22	48942035	48947328	5294	2	0,013709
95	<i>TWF2</i>	BTA22	48665271	48674428	9158	1	0,013743
96	<i>PCBP4</i>	BTA22	48966814	48976855	10042	1	0,013744
97	<i>ABHD14B</i>	BTA22	48961511	48965813	4303	1	0,013878
98	<i>DCP1A</i>	BTA22	47646509	47690571	44063	28	0,014304
99	<i>CCDC66</i>	BTA22	44401632	44442769	41138	6	0,019983
100	<i>ERC2</i>	BTA22	44539302	45520136	980835	254	0,027206
101	<i>CACNA1D</i>	BTA22	47161951	47508934	346984	130	0.028022
102	<i>DOCK3</i>	BTA22	49384664	49688439	303776	64	0,030836
103	<i>MANF</i>	BTA22	49379788	49383627	3840	1	0,032956
104	<i>CACNA2D3</i>	BTA22	45924532	46818527	893996	238	0.0623
105	<i>MLIP</i>	BTA23	6195936	6492034	296099	124	0,012876
106	<i>IP6K3</i>	BTA23	7852686	7877221	24536	2	0,013542
107	<i>RGL2</i>	BTA23	7465581	7473201	7621	3	0,013545
108	<i>ZBTB22</i>	BTA23	7483612	7486903	3292	1	0,013556
109	<i>SPDEF</i>	BTA23	8591536	8608900	17365	3	0,013558
110	<i>RING1</i>	BTA23	7395562	7399419	3858	1	0,013572
111	<i>TAPBP</i>	BTA23	7473583	7483259	9677	6	0,013593
112	<i>VPS52</i>	BTA23	7428093	7446221	18129	4	0,013594
113	<i>RPS18</i>	BTA23	7446290	7451048	4759	2	0,0136
114	<i>DAXX</i>	BTA23	7487552	7492251	4700	1	0,013615
115	<i>CUTA</i>	BTA23	7592050	7593652	1603	1	0,013622
116	<i>TAP2</i>	BTA23	7138820	7146579	7760	4	0,013622
117	<i>TAP1</i>	BTA23	7177596	7186556	8961	4	0,013628
118	<i>BOLA.DMB</i>	BTA23	7246590	7253434	6845	7	0.013629
119	<i>RPS10</i>	BTA23	8488466	8495419	6954	2	0,01363
120	<i>LRRC1</i>	BTA23	6593015	6727981	134967	46	0,013638

121	<i>RXRB</i>	BTA23	7379995	7386713	6719	1	0,013638
122	<i>KIFC1</i>	BTA23	7569904	7585473	15570	2	0,013639
123	<i>SYNGAP1</i>	BTA23	7594078	7625618	31541	11	0,013641
124	<i>KLHL31</i>	BTA23	6831320	6845419	14100	4	0,013646
125	<i>HMGA1</i>	BTA23	8313803	8322723	8921	1	0,01365
126	<i>BOLA.DOB</i>	BTA23	7114328	7122816	8489	1	0.013654
127	<i>PFDN6</i>	BTA23	7463411	7464809	1399	1	0,01366
128	<i>DSB</i>	BTA23	7035502	7055197	19696	9	0,013662
129	<i>MNF1</i>	BTA23	7814519	7840352	25834	1	0,013665
130	<i>MLN</i>	BTA23	7921495	7929357	7863	2	0,013671
131	<i>COL11A2</i>	BTA23	7349362	7378835	29474	9	0,013675
132	<i>PACIN1</i>	BTA23	8523678	8588640	64963	1	0,013675
133	<i>GRM4</i>	BTA23	8140143	8254606	114464	9	0,013689
134	<i>ITPR3</i>	BTA23	7745425	7821583	76159	10	0,0137
135	<i>BOLA.DYA</i>	BTA23	7072088	7077975	5888	3	0.013701
136	<i>GCLC</i>	BTA23	6982199	7026875	44677	7	0,013704
137	<i>WDR46</i>	BTA23	7453803	7463139	9337	2	0,013704
138	<i>ZBTB9</i>	BTA23	7626590	7629414	2825	3	0,013718
139	<i>PSMB9</i>	BTA23	7186354	7193346	6993	1	0,013719
140	<i>BOLA.DMA</i>	BTA23	7263693	7269361	5669	4	0.013721
141	<i>PSMB8</i>	BTA23	7173032	7177044	4013	1	0,013728
142	<i>BOLA.DYB</i>	BTA23	7096988	7113266	16279	1	0.013731
143	<i>PHF1</i>	BTA23	7586177	7591948	5772	2	0,013782
144	<i>NUDT3</i>	BTA23	8345335	8468528	123194	25	0,014419
145	<i>C23H6orf106</i>	BTA23	8635947	8743464	107518	30	0.0162
146	<i>CTSC</i>	BTA29	7375382	7415746	40365	10	0,013627
147	<i>RAB38</i>	BTA29	7501608	7568917	67310	22	0,013654
148	<i>GRM5</i>	BTA29	6557063	7201730	644668	207	0,021582

Genes expresados según el símbolo oficial de genes; inicio, fin y ancho son expresados en pb; número de SNPs: cantidad de marcadores SNP dentro del gen; p (mínimo, máximo y promedio) fueron calculados teniendo en cuenta los valores p individuales de todos los SNPs localizados dentro de cada gen.

Material suplementario del capítulo 3

Protocolo de extracción de ADN a partir de semen bovino

Primera parte: pretratamiento con buffer de lisis para desestabilizar la membrana plasmática y el acrosoma.

1. En 65ul de muestra de semen colocar 650ul de PBS, centrifugar 10' a 3000rpm y tirar el sobrenadante. Repetir.
2. Retirar el sobrenadante de PBS, dejando solo el pellet y añadir 200ul de buffer de lisis^a. Incubar a 4°C durante ~40', en ese tiempo vortear de vez en cuando.

Segunda parte: extracción convencional orgánica para muestras de sangre

1. A la muestra anterior con el buffer de lisis, agregar 500ul de buffer S^b, 20ul de Proteinasa k (10mg/ml) y 30 ul de ditionitrol (DTT) 0,5M
2. Incubar en un bloque a 55°C durante 3 horas o toda la noche.
3. Luego de la digestión, agregar 500ul de cloroformo, mezclar invirtiendo el tubo.
4. Centrifugar 5' a 6000 rpm. Pasar la fase acuosa (superior) a un nuevo tubo y repetir extracción orgánica.
5. Agregar 200ul de Acetato de Amonio 10M y centrifugar 5' a 6000 rpm.
6. Volcar la solución en un nuevo tubo. Mezclar suavemente. Dejar una hora a -20°C.
7. Centrifugar 15' a 6000 rpm, volcar el sobrenadante, secar la boca del tubo sobre papel.
8. Agregar 1ml de alcohol 70% frío y hacer girar el tubo en posición horizontal, para lavar las paredes. Centrifugar nuevamente 5' a 6000 rpm, volcar suavemente, secar la boca del tubo sobre papel.
9. Dejar secar a temperatura ambiente y luego disolver en 100 ul de agua destilada. Resuspender durante toda la noche a 37°C.

^aBuffer de lisis: para el buffer:0,73g de NaCl, 1,88 g de EDTA, 0,06g de Tris Base, 1ml de NaOH 2g/ml, 50 ml H₂O

DTT0,01G/ml, triton, buffer

^bBuffer S: 50mM de HCl-Tris, 25mM de DTT, 2% de N-Laurylsarcosine

Tabla suplementaria 1. Intervalos genómicos diferencialmente afectados por la endogamia

Población	Intervalo	Cromosoma	Inicio	Fin	Ancho	SNP's	p promedio	p mínimo	p máximo
Total	Intervalo-1	BTA5	76317361	76682917	365557	8	0,02275	0,007	0,06
Total	Intervalo-2	BTA14	25802251	26508236	705985	17	0,02170	0,009	0,04
Total	Intervalo-3	BTA14	26656634	26836013	179379	7	0,0115	0,005	0,02
Angus	Intervalo-4	BTA16	39479759	39661540	181781	5	0,0136	0,008	0,03
Angus	Intervalo-5	BTA16	39846669	40102423	255754	7	0,01771	0,01	0,04
Angus	Intervalo-6	BTA16	40223873	40457428	233555	6	0,015666	0,01	0,02
Angus	Intervalo-7	BTA16	41016073	41376739	360666	9	0,013333	0,01	0,02
Angus	Intervalo-8	BTA16	41542076	41659139	117063	3	0,0113333	0,01	0,014
Angus	Intervalo-9	BTA16	41949968	42497732	547764	14	0,0172142	0,009	0,05
Retinta	Intervalo-10	BTA14	25802251	26542736	740485	18	0,0165	0,01	0,03

Intervalo: regiones genómicas significativamente afectadas por la endogamia; **inicio, fin y ancho** son expresados en pb; **SNP's:** cantidad de marcadores SNP dentro del intervalo; **p (mínimo, máximo y promedio)** fueron calculados teniendo en cuenta los valores p individuales de todos los SNPs localizados dentro de cada intervalo.

Material suplementario del capítulo 4

Tabla suplementaria 1. Pseudo-fenotipos por individuo y carácter

Muestra	VCL	VSL	VAP	ALH	BCF
1	-2,0899	2,6218	1,0717	-0,1657	-0,5503
2	2,0334	5,7782	4,4695	-0,1806	0,2801
3	2,78	-6,706	-4,4601	0,6167	-1,0708
4	0,1995	5,1867	2,7315	-0,1203	0,5689
5	-11,276	-3,6274	-8,226	-0,3739	-0,3783
6	-0,614	-5,0789	-5,1737	0,0861	0,5837
7	7,754	1,8186	2,8432	0,4177	0,1308
8	-10,2797	3,9974	3,3253	-0,7497	-0,757
9	-9,0771	-5,3879	-6,5076	-0,298	-0,046
10	-12,9853	-11,4752	-11,4985	-0,2011	-0,8141
11	-7,7997	-5,0337	-5,941	-0,1679	-0,6439
12	-5,1544	-1,291	-3,6745	-0,1031	0,2794
13	-4,2253	-1,2599	-3,8937	-0,1154	0,3665
14	-10,0995	-6,8137	-7,853	-0,2718	-0,7989
15	-14,3896	-7,915	-8,6288	-0,4581	-1,2364
16	-4,9183	2,2405	1,8533	-0,4759	0,1931
17	6,9585	-0,6644	0,5578	0,414	0,4886
18	1,3756	7,8697	8,1007	-0,2624	0,3206
19	11,9623	8,7424	10,9179	0,2616	0,8507
20	-3,0169	3,8782	-2,1932	-0,181	0,738
21	10,2767	7,9923	10,1785	0,2523	-0,7227
22	7,2415	5,9598	4,7508	0,3492	0,2944
23	4,9606	1,616	3,1201	0,2125	0,408
24	4,2886	0,9369	2,1564	0,2514	-0,694
25	12,3711	3,8584	6,581	0,3704	0,3654
26	-11,4693	-4,6673	-7,9744	-0,4338	0,1933
27	1,1264	3,666	3,0542	0,0248	-0,0541
28	-3,1307	-0,3382	-0,3078	-0,1627	0,6004
29	-7,0964	-3,2683	-4,1663	-0,215	-0,8088
30	-5,0307	-4,8128	0,9763	-0,301	-1,1803
31	7,9092	5,5843	7,1421	0,0385	1,0072
32	1,8375	6,3321	3,1793	-0,1186	0,1958
33	7,7677	6,7495	8,193	0,0405	-0,4135
34	-4,3046	-6,7361	-6,6518	0,0953	0,14
35	-5,014	-3,2532	-8,3339	0,0288	0,1305
36	-10,119	-3,9698	-5,7393	-0,3831	-0,5066

37	17,396	-0,9394	5,8685	1,0258	0,0494
38	-0,5146	-1,8599	-1,0707	0,0897	0,0014
39	-2,9047	-8,9221	-4,708	0,0102	-0,9267
40	6,8387	-1,3849	0,6111	0,4779	-0,6181
41	14,0295	6,0349	8,2891	0,3935	0,8049
42	1,2684	1,4605	2,8339	-0,169	0,4984
43	5,2152	2,4121	4,018	0,0878	-0,06
44	-6,0201	-6,0134	-5,8854	-0,0286	-0,8141
45	2,1891	-3,1253	-5,1943	0,473	-0,0063
46	-14,2775	-7,1959	-10,4479	-0,4639	-0,7822
47	7,0467	4,0893	5,0253	0,2246	0,3308
48	-5,6723	-6,7196	-7,1011	-0,0325	-0,0602
49	-10,414	-9,4464	-7,5031	-0,2772	0,3404
50	9,163	6,1401	6,8009	0,2727	-0,0249
51	10,9752	10,0929	10,6898	0,1137	0,8657
52	6,3073	6,0014	5,4298	-0,0309	2,0948
53	10,6223	6,8455	8,3651	0,1124	0,8469

VCL: velocidad curvilínea (expresada en $\mu\text{m/s}$); VSL: velocidad en línea recta (VSL, expresada en $\mu\text{m/s}$); velocidad media de la trayectoria (VAP, expresada en $\mu\text{m/s}$); ALH: amplitud de desplazamiento lateral (expresado en μm); BCF: frecuencia del cruce de la cabeza con respecto a su trayectoria promedio (BCF, expresado en Hz)

Tabla suplementaria 2, Coeficientes F_{ROH} por individuo

Muestra	F_{ROH}	Grupo	Muestra	F_{ROH}	Grupo
1	0,0064	BE	33	0,1264	AE
2	0,0084	BE	34	0,1295	AE
3	0,011	BE	35	0,1305	AE
4	0,0112	BE	36	0,1322	AE
5	0,0127	BE	37	0,1343	AE
6	0,0141	BE	38	0,1361	AE
7	0,0167	BE	39	0,1483	AE
8	0,0197	BE	40	0,1497	AE
9	0,0239	BE	41	0,1545	AE
10	0,024	BE	42	0,1593	AE
11	0,0296	BE	43	0,1634	AE
12	0,0306	BE	44	0,1643	AE
13	0,0312	BE	45	0,1657	AE
14	0,0355	BE	46	0,1665	AE
15	0,0359	BE	47	0,176	AE
16	0,0417	BE	48	0,1862	AE
17	0,0434	BE	49	0,1863	AE
18	0,0514	BE	50	0,2015	AE
19	0,0621	BE	51	0,2354	AE
20	0,0622	BE	52	0,2704	AE
21	0,0701	BE	53	0,2723	AE
22	0,0723	BE			
23	0,0726	BE			
24	0,0837	BE			
25	0,0839	BE			
26	0,0929	BE			
27	0,0955	BE			
28	0,0999	BE			
29	0,1121	BE			
30	0,1125	BE			
31	0,1153	BE			
32	0,1193	BE			