



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA



FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS

Trabajo de tesis realizado como requisito para optar al título de

DOCTORA EN CIENCIAS VETERINARIAS

DETERMINACIÓN DE FACTORES GENÉTICOS ASOCIADOS A LA INFERTILIDAD EN LA ESPECIE EQUINA

AUTORA: Lic. en Ciencias Biológicas PIROSANTO, Yamila

DIRECTOR: Dr. DEMYDA PEYRÁS, Sebastián.

LUGAR DE TRABAJO

Instituto de Genética Veterinaria “Ingeniero Fernando Noel Dulout” (IGEVET)

MIEMBROS DEL JURADO

Dra. NEILD, Débora

Dra. Kienast, Mariana

Dra. ANTONINI, Alicia

2024

AGRADECIMIENTOS

A la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata por brindarme educación gratuita y de calidad durante todos estos años.

A AGENCIA y CONICET por su programa de becas doctorales que me permitieron realizar la carrera de doctorado.

A mi director de tesis Dr. Sebastián Demyda Peyrás, por la formación brindada y la constante supervisión durante todo el proceso de investigación y elaboración de la tesis.

Al IGEVET por abrirme sus puertas y poner a disposición sus recursos e instalaciones para desarrollar este trabajo.

Al grupo de Investigación MERAGEM de la Universidad de Córdoba (España), por las acertadas intervenciones de Antonio Molina durante el análisis de los datos.

A todos mis compañeros y amigos del Becariado, los que estuvieron desde el principio y los que se sumaron en el camino, por los consejos y el aliento, por las juntadas, los mates, los asados y todos los momentos compartidos.

A mis compañeros de la Cátedra de Histología y Embriología y a la Catedra de Genética de Poblaciones y mejoramiento, por permitirme formar parte y por el apoyo en todos estos años.

A mis amigos de Ayacucho, Mar del Plata y La Plata, por estar ahí incondicionalmente desde siempre.

Muy especialmente a mi familia, por el acompañamiento y el enorme esfuerzo que hicieron siempre, a pesar de todo, para darme la oportunidad de estudiar lo que había elegido y acompañarme en toda mi formación profesional.

Finalmente, a todas las personas que de una u otra manera colaboraron y sus aportes hicieron posible la concreción de esta tesis.

CITAS BIBLIOGRAFICAS CORRESPONDIENTES A CONGRESOS Y PUBLICACIONES Y LA TESIS

- Pirosanto Yamila, Valera Mercedes, Molina Antonio and Demyda-Peyrás Sebastián. Sperm quality is affected by the inbreeding value and age of the individuals in Spanish Purebred horses. International Embryo Technology Society. 46th Annual Conference. New York, USA. 2020. Pirosanto Yamila; Molina Antonio; Valera, M.; Dorado Jesus; Teran Ester; Azcona Florencia; Demyra-Peyras Sebastian. Increased inbreeding levels negatively affect sperm kinetics and motility in Purebred Spanish horses. Congress. 47th International Embryo Tecnology Society. International Society for Animal Genetics. Perú. Lima. 2021.
- Pirosanto Yamila, Teran Ester y Demyda-Peyras Sebastian. Determinación de quimerismo en caballos pura raza española mediante danfip a partir de paneles-SNP". Rosario, Argentina. Diciembre 2021. "XXI Jornadas de Divulgación Técnico Científicas, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de Rosario."
- Pirosanto Yamila, Laseca Nora, Azcona Florencia, Molina Antonio, Valera M., Demyda-Peyrás Sebastian. Pseudoautosomal región as a key factor for the molecular detection of Turner's syndrome in horses. 72nd Annual Meeting of the European Federation of Animal Science, Davos, Switzerland 2021.
- Pirosanto Yamila, Teran Ester, Molina Antonio, Lavitola Josefina and Demyda-Peyrás Sebastián. Inter and intra stallion analysis of the kinematic sperm subpopulations in fresh ejaculates of Pura Raza Española horses. 49th Conference of the International Embryo Technology Society, Lima, Perú. 2023.

- Piro Santo Yamila, Laseca Nora, Valera Mercedes., Molina Antonio., Moreno-Millán Miguel, Bugno-Poniewierska Monika, Ross Pablo, Azor Pedro and Demyda-Peyrás Sebastian. (2021) Screening and detection of chromosomal copy number alterations in the domestic horse using SNP-array genotyping data. *Animal Genetics*. DOI: 10.1111/age.13077.

INDICE DE CONTENIDOS

Agradecimientos	2
Citas bibliográficas correspondiente a congresos y publicaciones y la tesis	4
Abreviaturas y símbolos	15
Resumen	17
Abstract	18
INTRODUCCIÓN.....	19
1. Caballos Pura Raza Española.....	19
1.1 Origen y características del Pura Raza Española	19
1.2 Sistema de crianza del caballo Pura Raza Española	21
2. Fertilidad en los equinos.....	22
2.1 La calidad espermática como factor de fertilidad.....	23
2.2 La endogamia como factor predisponente a la baja de fertilidad.	27
2.3 Las cromosomopatías como factor de fertilidad	30
2.3.1 El uso de marcadores moleculares	32
OBJETIVOS GENERALES	35
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	35
CAPITULO I: Efecto de la consanguinidad sobre características fenotípicas de la calidad seminal en caballos de pura raza española.....	36
Introducción	36

Metodología.....	38
Parámetros seminales rutinarios	38
Caracterización cinética	39
Determinación del nivel de consanguineidad.....	39
Análisis estadístico	40
Resultados.....	40
Efecto de la edad sobre la calidad seminal	40
Efecto de la endogamia sobre la calidad seminal	42
Discusión	45
 CAPITULO II: Impacto de la congelación y el diluyente empleado en el patron de subpoblaciones espermaticas en sementales equinos.....	 54
Introducción	54
Metodología.....	57
Recolecta de semen	57
Diseño experimental	57
Congelación de esperma.....	60
Análisis cinético de los eyaculados	60
Agrupación de subpoblaciones.....	61
Análisis estadístico	62
Resultados.....	62

Tratamiento de datos y agrupación de subpoblaciones	62
Caracterización cinética de las subpoblaciones.....	63
Efecto del diluyente con respecto al tiempo sobre las subpoblaciones espermáticas en muestras frescas y congeladas.....	64
Efecto del congelado en el diluyente BT (Botucurio)	67
Efecto de la congelación en el diluyente MR (Spectrum Red)	68
Discusión	69
CONCLUSIONES SOBRE LOS ANALISIS DE LA CALIDAD SEMINAL.....	73
CAPITULO III: Detección y analisis de alteraciones del número de copias cromosómicas en el caballo doméstico mediante datos de genotipado de matrices SNP	75
Introducción	75
Metodología.....	78
Animales.....	78
Cariotipado y análisis molecular	79
Genotipado mediante SNP-array	79
Análisis de CNA	81
Análisis estadístico	82
Resultados.....	82
Análisis molecular y Cariotipado.....	82
Detección de CNA basada en SNP.....	83
Discusion	88

CAPITULO IV: Cuantificación del grado de quimerismo intersexual (64,XY/64,XX) en caballos utilizando datos de genotipado de polimorfismo de nucleótido único de densidad media...96

Introducción.....	96
Metodología.....	100
Muestras	100
Extracción de ADN	100
Genotipado mediante SNP-array	101
Cuantificación del grado de quimerismo mediante análisis de distribución de probabilidad integrada (DANFIP)	101
Diseño experimental	102
Parte I: Validación de la metodología DANFIP utilizando muestras quiméricas experimentalmente producidas in vitro.	102
PARTE II: Utilización de DANFIP en equinos portadores de quimerismo sexual	103
Resultados.....	103
Parte I: Validación del DANFIP en muestras quiméricas producidas in vitro.....	103
Parte II: Utilización del DANFIP en equinos portadores de quimerismo sexual	107
Discusion	109
Precisión de DANFIP en muestras quiméricas conocidas y desconocidas.....	111
CONCLUSIONES SOBREL OS ANALISIS DE ANOMALIAS CROMOSOMICAS	114
CONCLUSION GENERAL.....	116
REFERENCIAS.....	117

ÍNDICE DE IMÁGENES

Imagen 1. Yegua Pura Raza Española. Facilitada por la Asociación Nacional De Criadores de Caballos De Pura Raza Española (ANCCE).....	20
Imagen 2. Macho Pura Raza Española. Doma clásica en Olimpiadas de Londres. Facilitada por La Asociación Nacional De Criadores De Caballos de Pura Raza Española (ANCCE).....	21
Imagen 3. Análisis Espermático Asistido por Computadora (CASA) del Instituto de Reproducción Animal Córdoba, Argentina (IRAC).....	25

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Efecto de la edad sobre la concentración espermática.....	41
Figura 1.2. Efecto de la edad sobre el volumen seminal.....	42
Figura 1.3. Efecto de la endogamia sobre el volumen seminal.....	43
Figura 1.4. Efecto de la endogamia sobre la motilidad progresiva.....	44
Figura 2.1. Efecto del diluyente y el tiempo sobre la población 1, lentos progresivos.....	65
Figura 2.2. Efecto del diluyente y el tiempo sobre la población 2, hiperactivos.....	66
Figura 2.3. Efecto del diluyente y el tiempo sobre la población 3, rapido progresivo.....	67
Figura 2.4. Efecto del congelado sobre el diluyente Botucro sobre las subpoblaciones de estudio.....	68
Figura 2.5. Efecto del congelado sobre el diluyente Spectrum Red sobre las subpoblaciones de estudio.....	69
Figura 3.1. Valores de frecuencia alélica B y log R de los grupos de estudio.....	85
Figura 3.2. Diagrama de densidad de los valores de frecuencia de alelos B en el grupo 64,XX/64,XY.....	88
Figura 4.1. Análisis CDF de las cinco muestras quiméricas producidas in vitro con diferentes grados de quimerismo.....	105
Figura 4.2. Distribución del BAF a la posición de SNPs en el cromosoma X y cromosoma 10 en caballos quimericos.....	106
Figura 4.3 Diagrama de dispersión de los CDF del DANFIP	109

FIGURAS SUPLEMENTARIAS

Figura S1.1. Efecto de la edad sobre la motilidad progresiva.....	51
Figura S1.2. Efecto de la edad sobre la motilidad total.....	51
Figura S1.3. Efecto de la edad sobre los parámetros cinéticos.....	52
Figura S1.4. Efecto de la endogamia sobre la motilidad total.....	53
Figura S1.5. Efecto de la endogamia sobre la concentración espermática.....	53

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.1 Efecto del aumento de la endogamia sobre los parámetros de motilidad espermática.....	45
Tabla 2.1 Valores de parámetros cinéticos arrojados por el CASA.....	63
Tabla 3.1 Análisis de las medias de log R ratio (LRR) y heterocigosidad (HET) en siete grupos de caballos PRE con diferentes sexo-cariotipos utilizando un conjunto de datos SNP de alta densidad.....	86
Tabla 4.1 Cuantificación del grado de quimerismo determinado mediante DANFIP en las ECAX y ECA10 obtenidas de 5 muestras quiméricas 64,XY/64,XX producidas in vitro.....	104
Tabla 4.2. Cuantificación del grado de quimerismo mediante DANFIP.....	108

TABLAS SUPLEMENTARIAS

Tabla S.3.1 Lista de los individuos con anomalías cromosómicas incluidas en este estudio...94

Tabla S.3.2 Análisis de las medias de LRR y HET en 7 grupos de caballos PRE con diferentes cariotipos de sexo utilizando un conjunto de datos MD SNP.....95

Tabla S.3.2 Análisis de las medias de LRR y HET en 7 grupos de caballos PRE con diferentes cariotipos de sexo utilizando un conjunto de datos LD SNP.....95

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

ALH: amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza

BCF: frecuencia del cruce de la cabeza con respecto al punto medio de su trayectoria

BT: Botucurio™

CASA: Análisis Automatizado Asistido por Computadora (*Computer assisted sperm analysis*)

CNA: Alteraciones en el Número de Copias (*Copy Number Alteration*)

CNV: Variaciones en el Número de Copias (*Copy Number Variation*)

DE: Desvío estándar.

DANFIP: Análisis de distribución mediante ajuste de probabilidades integradas.

ECA: Cromosoma de *Equus Caballus*

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

GO: Ontología génica.

IA: Inseminación Artificial

IRAC: Instituto de Reproducción Animal Córdoba

LD: Desequilibrio de Ligamiento (*Linkage Disequilibrium*)

LIN: Linealidad

Mb: Megabase.

Bp: Pares de bases.

PRE: Pura Raza Española

MR: Minitube Spectrum Red SBS Cryosystem™

ROH: bloques de homocigosidad (*Runs of Homozygosity*).

SNP: Polimorfismo de nucleótido simple (*Single Nucleotide Polimorfism*).

Sp: Subpoblaciones

Spz: Espermatozoides

STR: Rectitud

VAP: Velocidad promedio de la trayectoria

VCL: Velocidad curvilínea

VSL: Velocidad en línea recta

WOB: Oscilación

DETERMINACIÓN DE FACTORES GENÉTICOS ASOCIADOS A LA INFERTILIDAD EN LA ESPECIE EQUINA

RESUMEN

El objetivo general de esta tesis es estudiar las bases genéticas que producen variaciones en la fertilidad de la especie equina asociadas al incremento de la endogamia y/o la presencia de anomalías cromosómicas.

Los análisis de calidad seminal se llevaron a cabo utilizando nuevas metodologías de evaluación espermática (CASA), los cuales ha permitido estudiar las características y funciones de los espermatozoides en forma individual, con un enfoque poblacional basado en el estudio de grandes cantidades de información.

La aparición de anomalías cromosómicas se analizó mediante datos de genotipados utilizando SNP array. La detección de alteraciones en el número de copias se realizó mediante el análisis conjunto de LRR y BAF.

Con respecto a la calidad seminal, se concluyó que los altos niveles de consanguinidad pueden comprometer la calidad espermática, pudiendo tener una influencia negativa en la fertilidad. Por otro lado, se demostró que el uso del CASA y el análisis de subpoblaciones son un buen método para estudiar la calidad del semen. Además, se determinó el efecto negativo de la congelación sobre la calidad seminal y la efectividad del diluyente botucricio.

Con relación a las anomalías cromosómicas, hemos desarrollado una técnica analítica sencilla y robusta para detectar algunas de las anomalías cromosómicas más importantes en caballos mediante el análisis de los datos de intensidad producidos por arrays de SNP. Además, hemos validado la metodología DANFIP para cuantificar el grado de quimerismo utilizando información genómica obtenida a partir de plataformas comerciales de genotipado SNP.

Comprender cómo las anomalías cromosómicas y la calidad del esperma afectan la fertilidad en los equinos, permitirá desarrollar estrategias de reproducción más efectivas. Pudiendo mejorar la tasa de fertilidad y reducir los problemas reproductivos en la cría equina. Además, permitirá a los criadores seleccionar los mejores reproductores para mejorar la calidad genética y reducir pérdidas económicas.

Palabras claves: Infertilidad, Pura Raza Española, Anomalías cromosómicas, Calidad seminal.

DETERMINATION OF GENETIC FACTORS ASSOCIATED WITH INFERTILITY IN HORSES

ABSTRACT

The general objective of this thesis is to study the genetic bases that produce variations in the fertility of the equine species associated with increased inbreeding and/or the presence of chromosomal abnormalities.

Semen quality analyses were carried out using new methodologies of sperm evaluation (CASA), which has allowed the study of the characteristics and functions of individual spermatozoa, with a population approach based on the study of large amounts of information.

The occurrence of chromosomal abnormalities was analyzed by genotyping data using SNP array. Detection of copy number alterations was performed by joint LRR and BAF analysis.

With respect to semen quality, it was concluded that high levels of inbreeding can compromise sperm quality and may have a negative influence on fertility. On the other hand, it was demonstrated that the use of CASA and subpopulation analysis is a good method to study semen quality. In addition, the negative effect of freezing on semen quality and the effectiveness of the botulinum extender was determined.

In relation to chromosomal abnormalities, we have developed a simple and robust analytical technique to detect some of the most important chromosomal abnormalities in horses by analyzing the intensity data produced by SNP arrays. In addition, we have validated the DANFIP methodology to quantify the degree of chimerism using genomic information obtained from commercial SNP genotyping platforms.

Understanding how chromosomal abnormalities and sperm quality affect fertility in equines will enable the development of more effective breeding strategies. This will improve fertility rates and reduce reproductive problems in equine breeding. In addition, it will allow breeders to select the best breeding stock to improve genetic quality and reduce economic losses.

Keywords: Infertility, Purebred Spanish Horse, Chromosomal abnormalities, Semen quality.

INTRODUCCIÓN

La cría de caballos es una actividad pecuaria de gran relevancia a nivel mundial. En Argentina, esta actividad genera cerca de 300 mil empleos de forma directa e indirecta, con un volumen económico que ronda los 300 millones de dólares por año (MAGyP, 2022b), principalmente por la venta de individuos reproductores y derivados de la faena de animales. Argentina es un país que se caracteriza por tener una fuerte tradición en la producción equina, la cual se asocia principalmente al trabajo rural y al deporte. Esto ha incentivado la cría de caballos de diferentes razas y con distintas finalidades (Azcona, 2023). Según el MAGyP, existen en nuestro país cerca de 2.500.000 equinos registrados (MAGyP, 2022a), incluyendo más de 20 razas diferentes, dentro de las cuales se encuentra la Pura Raza Española. Si bien los experimentos llevados a cabo en esta tesis doctoral se centran en razas que no son predominantes en la Argentina, el enfoque poblacional utilizado permitirá la extrapolación de buena parte de los resultados a las razas más importantes de nuestro país.

1. CABALLOS PURA RAZA ESPAÑOLA

1.1 ORIGEN Y CARACTERÍSTICAS DEL PURA RAZA ESPAÑOLA

El caballo de Pura Raza Española (PRE) es originario de Andalucía y es la principal raza equina de la Península Ibérica. Su denominación racial procede del siglo XV, encontrándose entre las razas equinas más antiguas del mundo (Sánchez y col., 2014). Esta raza genera uno de los sistemas de producción ganadera más importantes de España, con un volumen de producción cercano a los 15,000 inscriptos por año (Sánchez-Guerrero y col., 2016). Sin

embargo, su importancia va más allá de los beneficios económicos que genera, ya que también es reconocido como icono y seña de identidad de la cultura y tradiciones españolas (Anaya y col., 2017). Los caballos PRE son fuertes, elegantes y de fino temperamento, por lo tanto, su selección siempre se ha basado en estas cualidades (Muñoz y col., 1997). Su conformación es proporcionada, con una notable armonía general y de gran belleza con apreciables dimorfismos sexuales. La alzada o altura a la cruz es, entre 154 y 172 cm en los machos y entre 152 y 170 cm en las hembras (MAPA, 2020). Presentan un cuello fuerte y arqueado, cubierto de una crinera larga y colgante. Su cabeza es mediana y ligeramente convexa (cabeza de halcón), con un pecho amplio y una grupa redondeada y potente. Presenta un porte elegante con armoniosas proporciones. Actualmente se admiten todos los colores de capa menos el pío (MAPA, 2023).



Imagen 1. Yegua Pura Raza Española. Imagen facilitada por la Asociación Nacional De Criadores de Caballos de Pura Raza Española (ANCCE). Año: 2008, Sexo: Hembra.

El caballo PRE es fácil de montar, por lo que se utiliza como caballo de paseo. Se usa en las disciplinas de la doma clásica, doma vaquera y en el rejoneo. En la doma clásica destaca por su buena cabeza, excelente trote, buena reunión, piaffé y passage casi perfecto.



Imagen 2. Doma Clásica en Olimpiadas de Londres. Imagen facilitada por La Asociación Nacional de Criadores de Caballos de Pura Raza Española (ANCCE). Año: 2013, Sexo: Macho.

1.2 SISTEMA DE CRIANZA DEL CABALLO PURA RAZA ESPAÑOLA

El manejo reproductivo de esta raza está basado principalmente en la monta natural, y la inseminación artificial (IA). En algunas ocasiones se realiza la transferencia de embriones, de forma limitada. Estos métodos permiten una mayor difusión de las distintas líneas genéticas existentes entre los criadores, con la ayuda de programas de mejora genética. La IA es una

técnica reproductiva que consiste en depositar esperma, en el aparato reproductor de la hembra, sin la directa intervención del macho. Esta técnica es ampliamente utilizada, ya que ayuda a mejorar el manejo reproductivo y la fertilidad, reduce el riesgo de transmisión de enfermedades, facilita los programas de selección y mejora genética y permite poder disponer de esperma de buena calidad en zonas alejadas de donde se localizan los donantes, con lo cual se reduce el riesgo de accidente en el transporte de animales. Sin embargo, esta técnica depende en gran medida de la adecuada calidad del semen del padrillo. Desde el punto de vista genético, el uso de la IA permite incrementar fuertemente la presión de selección por vía paterna, por ende, aumenta el progreso genético.

La reglamentación del uso de procedimientos reproductivos está descrita en el libro genealógico de la raza, controlado por la Real Asociación Nacional de Criadores de Caballos Españoles (ANCCE). En la actualidad solo está permitido el uso de IA cuando el semen es recogido de animales que pertenecen al Registro Definitivo del Libro Genealógico de la raza. En el caso de la transferencia embrionaria, tanto las hembras donantes como las receptoras, deberán estar inscritas en el Registro Definitivo del LG PRE, aunque última práctica no es habitual en esta raza.

2. FERTILIDAD EN LOS EQUINOS

Ha sido ampliamente demostrado que la fertilidad es uno de los factores clave en el éxito productivo y económico de las explotaciones dedicadas a la cría de caballos, tanto en nuestro país (Paz y col., 2013), como a nivel mundial (Allen y Wilsher, 2018). Es por ello, que el estudio de la fertilidad, particularmente en los animales de producción, tiene una gran importancia. En equinos, especie en la cual su fertilidad se encuentra entre las más bajas de

los animales domésticos, la eficiencia reproductiva se ha relacionado con numerosas causas entre las que se encuentran la edad, problemas fisiológicos y hormonales (Morley y Murray, 2014; Scoggin, 2015), el manejo reproductivo (Aurich, 2012), los problemas de calidad seminal y alteraciones en el comportamiento reproductivo en los machos (Madill, 2002), entre otras. Pero también se ha demostrado la existencia de factores genéticos que pueden afectar la fertilidad en la especie (Wolc y col., 2009). Estas últimas, aún no han sido comprendidas en su totalidad a nivel genómico, afectan a todas las razas, generando pérdidas económicas para los criadores debido al costo de los servicios veterinarios, cuidado de los animales y pérdidas de producción (Lear y Bailey, 2008). En el marco de esta tesis doctoral, se evaluó tres factores que afectan la fertilidad en equinos: la calidad seminal, la tasa de endogamia y la aparición de cromosomopatías.

2.1 LA CALIDAD ESPERMÁTICA COMO FACTOR DE FERTILIDAD

La productividad de cualquier especie ganadera está altamente influenciada por su eficiencia reproductiva, la cual es la resultante de la asociación de factores biológicos, genéticos, ambientales y de manejo. En los equinos, en particular, un factor importante en dicha eficiencia es en ocasiones la alta variabilidad en la calidad seminal observada entre diferentes sementales (Loomis y Squires, 2005). En este sentido, es bien sabido que en los equinos, existen sementales que no son aptos para criopreservar sus gametas adecuadamente, lo cual limita su difusión como reproductores entre criadores ubicados a grandes distancias o diferentes países (Squires, 2009). Si bien las causas que producen dicha variabilidad entre sementales no están claras, han sido principalmente asociadas a factores genéticos. Esta falta de consistencia en la calidad seminal entre individuos está ampliamente difundida en las diferentes disciplinas ecuestres (salto, doma clásica, carreras de endurance,

etc) y afecta también al sistema de producción del caballo de Pura Raza Española, caracterizado por la alta movilidad de dosis seminales entre ganaderos. Esto hace que lograr una buena calidad seminal sea importante.

El estudio de la calidad del semen en equinos se suele realizar de forma sistemática en animales de alto valor durante los últimos años, debido a la implementación de la inseminación artificial (Gottschalk y col., 2016). Es por ello, que de manera rutinaria se realizan análisis seminales básicos, que incluyen la valoración morfológica espermática y su motilidad de manera subjetiva por observación directa a través de un microscopio, para identificar variaciones que afecten la fertilidad (Gadea, 2005). Este hecho genera dos problemas a la hora de extrapolar datos entre diferentes estudios y/o centros. Por un lado, existe variabilidad en la observación entre los técnicos que realizan la evaluación y puede dar lugar a sub o sobre estimaciones de los valores de motilidad con diferencias en la misma muestra de hasta el 20% entre operadores (Amann, 2006). Por otro lado, y más importante aún, el análisis espermático subjetivo, que solo aporta tres datos por cada eyaculado, dos de motilidad espermática (total y progresiva) y el de morfología espermática (% de anomalías) por cada muestra seminal del individuo (sin tener en cuenta pruebas complementarias), y no brinda información alguna sobre los patrones de movimiento de cada espermatozoide.

El uso de nuevas metodologías de evaluación espermática, como el análisis automatizado asistido por computadora (CASA, Figura 3), ha permitido estudiar las características y funciones de los espermatozoides en forma individual, con un enfoque poblacional basado en el estudio de grandes cantidades de información (Thurston y col., 2003). Esta aproximación permite además detectar y cuantificar la heterogeneidad de cada muestra, ya

que analiza cada espermatozoide individualmente, aumentando la objetividad y sensibilidad de los resultados (Gadea, 2005).

Esta técnica facilita la evaluación rápida de un gran número de espermatozoides y determina varios aspectos de la funcionalidad espermática (Gacem y col., 2021; González Villalobos y col., 2008). En general, el análisis CASA determina al menos 10 datos de movimiento de cada espermatozoide, incluyendo parámetros de motilidad, progresividad, linealidad, y velocidad individual, que permite caracterizar el patrón y frecuencia de movimiento. Similarmente, el uso de técnicas de análisis de morfometría espermática (CASMA), permite evaluar la forma de la cabeza del espermatozoide mediante 7 parámetros morfológicos estimados individualmente.



Imagen 3. Computer-assisted sperm analysis (CASA) del Instituto de Reproducción Animal Córdoba, Argentina (IRAC).

Como se mencionó anteriormente, el uso de metodologías más objetivas y sensibles para la evaluación de la calidad seminal es un factor importante, pero no el único. En este aspecto, la criopreservación del semen es una técnica que complementa a los procesos de biotecnologías reproductivas y análisis de calidad seminal, y que además, permite el uso de los mejores caballos en distintas locaciones geográficas y atemporalmente. El desarrollo de protocolos confiables de criopreservación, permite el intercambio de semen entre diferentes poblaciones que son geográficamente distantes, permitiendo que se diversifique la variabilidad genética (Pérez-Garnelo y col., 2006). En consecuencia, la criopreservación aumenta la disponibilidad de material genético de calidad facilitando así los trabajos de reproducción asistida. Por otro lado, permite programar una inseminación artificial en base a la fisiología natural de una yegua, incluso con animales cuyo semen ha sido congelado y almacenado por décadas (Pessanha Barreto y col., 2008; Samper y Hankins, 2001). Sin embargo, existe una gran variabilidad en la habilidad de los espermatozoides entre los sementales para soportar el proceso de congelación, e incluso existe variación de los eyaculados y fertilidad dentro de un mismo caballo (Barreto y col., 2010; Ocampo y col., 2013).

El proceso de congelado puede causar diversos daños en la célula espermática. Por este motivo, es importante el estudio de las muestras seminales previo y posterior al congelado para poder determinar la tasa de éxito de la técnica, y adecuar los protocolos de congelación a cada animal (Polge, 1957). El éxito de los programas de criopreservación en equinos se ha logrado incrementar gracias a la utilización de diluyentes específicos, que reducen la formación de cristales de hielo intracelular durante la congelación e inhiben la actividad de varias enzimas disminuyendo o eliminando la actividad de radicales libres antes, durante y

después de la congelación y descongelación (Chang y Zhao, 2021) . Sin embargo, los diluyentes pueden producir dos tipos de alteraciones en las células: una funcional, caracterizada por la inactivación proteica y enzimática y otra estructural, relacionada con el estrés osmótico ocasionado por los cambios en volumen experimentados por la célula espermática (FAHY, 1986; León y col., 2007). Si bien, la congelación y descongelación producen daños irreversibles en las células, disminuyendo su esperanza de vida en el tracto femenino (Ortega Ferrusola y col., 2009; Watson, 2000), su magnitud puede ser limitada adecuando el protocolo a cada caballo (Oliveira y col., 2013; Ricker y col., 2006). Por este motivo, la evaluación de nuevos diluyentes para inseminación y congelación, así como la adecuación de su uso en términos individuales es una técnica de gran importancia en la reproducción equina.

2.2 LA ENDOGAMIA COMO FACTOR PREDISPONENTE A LA BAJA DE FERTILIDAD.

La pérdida de variabilidad genética en las poblaciones ganaderas criadas bajo estrictos procesos de selección es motivo de creciente preocupación. Uno de sus efectos directos es el aumento de los valores de consanguinidad, definida como el proceso por el cual se aparean animales genéticamente emparentados, produciendo descendencias con un mayor nivel de homocigosis (Cole, 2024). Esto, a su vez, tiene efectos fenotípicos adversos, conocidos como depresión endogámica (Charlesworth y Charlesworth, 1999). Este fenómeno se caracteriza por la disminución de la media fenotípica de la población en caracteres asociados a la viabilidad y capacidad de adaptación de los animales, así como a caracteres de performance reproductiva (Lacy, 1997; Leroy, 2014) y fertilidad (Doekes y col., 2021).

La diversidad genética en los caballos es de una magnitud considerable entre razas, mientras que la variación dentro de cada raza es mucho menor (McCue y col., 2012). Esto se debe a que muchas razas (principalmente europeas) se han desarrollado en condiciones más o menos aisladas, debido a diversas razones, como ser límites geográficos, por la selección de características específicas (como la conformación, el color o la marcha) y a la creación de libros genealógicos cerrados en los que ya no se permitía la cría de caballos procedentes de otros libros genealógicos. Todos estos efectos han provocado un aumento de la consanguinidad. En la especie, esto es un problema particularmente importante, dado que los individuos son criados en poblaciones cerradas y con cruzamientos específicos con el objetivo de aumentar su rendimiento o calidad, sin tener en cuenta su fertilidad (Perdomo-Gonzalez y col., 2022). Por ello, la depresión consanguínea es un fenómeno común en ciertas razas y animales (Poyato-Bonilla y col., 2020), y en particular en el caballo Pura Raza Española (Poyato-Bonilla, 2021). En el PRE, sus efectos fenotípicos más notables son la reducción de la fertilidad (Laseca y col., 2022) y la aparición de problemas morfológicos. Por ejemplo, en la población de caballos frisones, altamente endogámica, han surgido varios trastornos hereditarios, como el enanismo y la hidrocefalia, (Boerma y col., 2012; B. Ducro, 2011; Ducro y col., 2015; Leegwater y col., 2016). También se ha documentado un impacto negativo de la consanguinidad sobre la fertilidad (Goncalves y col., 2023; Ober y col., 1999).

El estudio de la endogamia se ha realizado históricamente por medio de los análisis del pedigrí de los animales, que estima el porcentaje teórico de alelos comunes que presenta un animal para todos sus locus (índice de endogamia F (Fisher, 1954)). En el caballo PRE, en particular este tipo de análisis comenzaron a realizarse hace más de 15 años (Valera y col., 2005). Sin embargo, la irrupción de tecnologías genómicas ha permitido aplicar una

metodología mucho más precisa basado en la estimación de los niveles reales de endogamia de los animales en diferentes regiones del genoma (Kardos y col., 2015). Hoy por hoy, la técnica más usada se basa en la estimación de la presencia de regiones genómicas denominadas ROH (*runs of homozygosity*), la cual se realiza utilizando marcadores de tipo SNP. Estas regiones tienen como característica diferencial que todos sus loci se encuentran en homocigosis, incluso aquellos en los cuales los alelos recesivos pueden afectar negativamente a las características del animal (Curik y col., 2014). Este tipo de análisis han permitido no solo ser más precisos en el estudio de la endogamia, sino que también acotar su efecto a ciertas regiones específicas, en las cuales el aumento de la homocigosis presenta efectos negativos en un carácter dado (Kardos y col., 2018). Pero además, siguiendo la teoría de Fisher (1954), Howrigan y col. (2011) demostraron que el largo de los ROH se puede asociar al número de generaciones transcurridas desde el evento endogámico. Los ROH largos derivan de un antepasado reciente, mientras que los más cortos, de un antepasado más distante (Curik y col., 2014), debido a la recombinación. Por ello, el análisis diferencial en base al largo de ROH es muy útil para estudiar los eventos genéticos de una población a lo largo del tiempo (Peripolli y col., 2017).

A partir de los análisis de ROH, se puede determinar el coeficiente de endogamia (F_{ROH}) de un individuo. El F_{ROH} se define como la proporción del genoma que se encuentra cubierta por dichos fragmentos (McQuillan y col., 2008), pero también permite calcular un coeficiente para cada cromosoma en particular, evidenciando su distribución y tamaño a nivel cromosómico. Por otro lado, la depresión endogámica no solamente está vinculada al porcentaje del genoma que se encuentra en homocigosis, sino también a su distribución (Laseca y col., 2022). Esto puede explicar por qué individuos con el mismo coeficiente de

consanguinidad tienen distinto grado de depresión endogámica (Perdomo-González y col., 2021). La identificación de estas regiones en homocigosis posibilita localizar los *loci* que están asociados a un cierto carácter, así como qué genes se encuentran en ellos, lo cual permite además inferir parcialmente las bases genéticas que lo gobiernan (Azcona, 2023). Sin embargo, la utilización de ROH en caballos y en asociación con rasgos relacionados a la fertilidad es relativamente escasa (Hill y col., 2023; Laseca y col., 2022) .

2.3 LAS CROMOSOMOPATÍAS COMO FACTOR DE FERTILIDAD

Dentro de los factores genéticos que afectan la fertilidad del equino se destaca la mayor incidencia de anomalías cromosómicas, respecto del resto de las especies domésticas (Villagómez y col., 2009). Tal es así, que este tipo de anomalías se han señalado como la causa de más del 50% de las infertilidades idiopáticas en caballos (Lear y col., 2008). En esta especie, más del 90% de las anomalías cromosómicas encontradas involucran los cromosomas sexuales, y suelen estar asociadas a problemas con la fertilidad (Chowdhary y Raudsepp, 2000).

En la actualidad no existe un acuerdo claro entre los distintos estudios realizados sobre la incidencia real de alteraciones genéticas de origen cromosómico a nivel poblacional en caballos (Lee y col., 2012). El único trabajo con un número significativo de animales analizados mediante cariotipo fue presentado por Bugno, Słota, y Kościelny (2007) demostrando que un 2% de los individuos presentaba algún tipo de alteración de tipo cromosómica. Sin embargo, estudios genómicos más recientes sitúan ese valor en niveles más bajos (Demyda-Peyrás y col., 2023). En este sentido, se ha demostrado que son tres las alteraciones cromosómicas más comunes que provocan infertilidad en caballos: el síndrome

de Turner, el síndrome de sexo reverso y el quimerismo, que abarcan aproximadamente el 70-80% del total de alteraciones (Lear y McGee, 2012). Si bien estas patologías no tienen tratamiento posible, es importante su detección precoz, ya que los animales afectados no podrán ser utilizados como reproductores en muchos de los casos.

La detección y diagnóstico de cromosopatías ha variado durante los últimos 40 años. Inicialmente, estas alteraciones eran determinadas mediante cariotipado (Hughes y Rommershausen-Smith, 1977) y posteriormente por metodologías moleculares simples (Bowling y Millon, 1990) e hibridación fluorescente in situ (Breen y col., 1997). Sin embargo, este tipo de técnicas son complicadas de realizar, habiendo pocos laboratorios en el mundo capaces de llevarlas a cabo (Lear y col., 2008). Es por ello, que existe un consenso entre los científicos abocados a esta problemática sobre la idea de que el número de animales diagnosticados es muy inferior al de los animales afectados. Tal es así, que mediante herramientas moleculares simples y robustas, el grupo de investigación MERAGEM de la Universidad de Córdoba (España) ha podido determinar en la Pura Raza Español una alta prevalencia de este tipo de alteraciones en animales infértiles sin causa aparente (Anaya y col., 2017), como así también que muchas de estas patologías no eran diagnosticadas debido a la falta de métodos poblacionales de *screening* adecuados. Si bien estas patologías están ampliamente extendidas a nivel mundial y en muchísimas razas diferentes (Lear y McGee, 2012), existen reportes que describen prevalencias incrementadas en ciertas líneas genéticas equinas específicas (Kent y col., 1988). En este sentido, Révay y col. (2012) y Martínez y col. (2020) demostraron la existencia de patrones de heredabilidad en este tipo de patologías en esta especie, lo que sugiere fuertemente la existencia de factores genéticos predisponentes. Por lo tanto, el hecho de contar con una herramienta de *screening*

diagnóstico específica para esta problemática puede facilitar el manejo de la infertilidad idiopática, así como la detección de animales estériles, permitiendo el ahorro de tiempo y dinero entre los criadores.

2.3.1 El uso de marcadores moleculares

Los estudios de caracterización genética de las distintas poblaciones animales, incluidos los realizados en la especie equina, han ido evolucionando conforme se han desarrollado nuevas técnicas de genética molecular. Con el avance de la tecnología, estas técnicas han sido reemplazadas por métodos más sofisticados y con una mejor capacidad de discernimiento a través del análisis del genoma de los individuos, mediante marcadores moleculares. Estas nuevas técnicas de biología molecular incluyeron en sus inicios el uso de marcadores genéticos basados en la detección de microsatélites (STR) (Juras y col., 2010). Sin embargo, existe una tendencia a reemplazar el uso de marcadores STR por SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*) debido a que estos últimos producen una elevada cantidad de información genética acerca de los individuos a un costo mucho menor y de manera automatizada. Es por ello, que los marcadores SNP son los más utilizados actualmente en la genética animal (Visscher y col., 2012), y si bien su variabilidad individual es menor, debido a que solo afectan a un nucleótido en cada cadena, su abundancia dentro del genoma los convierte en la fuente más frecuente de cambios polimórficos de los seres vivos.

Los SNP se utilizan para localizar genes de interés, para estudiar la presencia de enfermedades, rasgos fenotípicos e inclusive estudios comportamentales, desde hace más de 20 años en humanos (Ozaki y col., 2002). Desde ese momento, han entrado de lleno en la producción animal (Sharmaa y col., 2015) empleándose para la detección de susceptibilidad a enfermedades (Zanella, 2016) y estudio de caracteres productivos (Sanchez y col., 2014;

Wolc y col., 2014) y reproductivos (Aliloo y col., 2015; Sugimoto y col., 2015) en diferentes especies. Más recientemente, este tipo de estudios han aumentado su potencia de detección debido al desarrollo de nuevas estrategias de análisis de los datos (Schmid y Bennewitz, 2017) y al aumento de la densidad de marcadores presentes en los *microarrays*, que son las plataformas utilizadas para el genotipado masivo de SNP en un individuo. Adicionalmente, la disminución del costo por análisis ha permitido también un aumento en el número de animales analizados, aumentando la fiabilidad de los resultados obtenidos. En caballos, existen pocos *microarrays* comercialmente disponibles (Schaefer y McCue, 2020) siendo solo uno de ellos de alta densidad, lo cual puede condicionar la fiabilidad de los resultados. Estos *microarrays*, han permitido que se realicen una gran cantidad de estudios en la especie, relacionados con la performance deportiva (Avila y col., 2018), color del pelaje (Dürig y col., 2017), manchas de la piel (Ludwig y col., 2015) y conformación física (Frischknecht y col., 2016), entre otros.

HIPÓTESIS

1. El aumento de la tasa de endogamia individual produce variaciones en la fertilidad de los machos equinos, afectando la calidad y cantidad del movimiento espermático.
2. Existen factores genómicos predisponentes a la aparición de anomalías cromosómicas en el par sexual asociadas a la infertilidad en el equino.
3. El aumento de la tasa de endogamia individual puede incrementar la prevalencia de anomalías cromosómicas asociadas al par sexual en la especie equina.

OBJETIVOS GENERALES

Estudiar las bases genéticas que modulan la aparición de fallas reproductivas en la especie equina causadas por un descenso de la calidad espermática o por la presencia de anomalías cromosómicas.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Determinar el efecto de la consanguinidad sobre las características fenotípicas del esperma equino.
2. Determinar el efecto del diluyente en subpoblaciones cinéticas de sementales de la especie equina utilizando tecnologías de medición objetivas asistidas por computadora (CASA), en semen fresco y congelado.
3. Desarrollar una metodología simple y robusta que permita detectar las anomalías cromosómicas asociadas a la falta de fertilidad en la especie equina.
4. Implementar y validar la aplicabilidad de la metodología DANFIP para detectar el grado de quimerismo en la especie equina, a partir de datos de genotipados por SNP.

CAPÍTULO I: EFECTO DE LA CONSANGUINIDAD SOBRE CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS DE LA CALIDAD SEMINAL EN CABALLOS DE PURA RAZA ESPAÑOLA

INTRODUCCIÓN

El rendimiento reproductivo es uno de los factores clave para la producción ganadera en diferentes especies, por lo cual todas las medidas que se tomen para su mantenimiento o mejora son pertinentes. Se sabe que los rasgos reproductivos están influenciados, entre otros factores, por la composición genética del individuo, así como por el aumento de los niveles de consanguinidad. Este último produce un efecto conocido como depresión endogámica, producida por el apareamiento de individuos emparentados estrechamente, la cual se ha asociado a una reducción de la fertilidad en varias especies. En particular, el aumento de la endogamia se ha asociado con cambios en la motilidad y la forma del esperma en varias especies (Doekes y col., 2021; Lawrence y col., 2017; Teran y col., 2021). Se ha sugerido que la disminución de la fertilidad de los machos es una de las primeras consecuencias de un mayor nivel de consanguinidad, ya que las mutaciones se producen con mucha más frecuencia en la línea germinal masculina (Gomendio y col., 2000; Shimmin y col., 1993). En los toros, la consanguinidad tiene un efecto negativo sobre el tamaño del escroto, la motilidad espermática, la concentración de espermatozoides y el porcentaje de espermatozoides morfológicamente normales (Dorado y col., 2017; Maximini y col., 2011). Las gacelas, una especie en peligro de extinción, presentan alto nivel de endogamia que se correlaciona negativamente con la calidad del semen, con altos coeficientes de

consanguinidad asociados a un menor porcentaje de espermatozoides morfológicamente normales y móviles (Gomendio y col., 2000). Por tal motivo, es plausible que la reducción del rendimiento reproductivo en una población altamente consanguínea se deba en buena medida a una menor calidad del semen que puede reflejarse en una menor fertilidad masculina.

En la especie equina, el aumento de la consanguinidad es un problema común debido a la reducción del tamaño efectivo de la población y al aumento de la intensidad de selección observado en varias razas (Dini y col., 2020). En caballos trotadores y pura sangre noruegos, se ha propuesto que la consanguinidad explica la alta incidencia de pérdidas precoces de gestación y la baja tasa de concepción (Cothran y col., 1984; Klemetsdal y Johnson, 1988). Algo similar ocurre en caballos pura sangre de Australia (Todd y col., 2020). En este sentido, Laseca, Demyda-Peyras, y col. (2022) demostraron que la consanguinidad reduce significativamente la fertilidad en hembras. En machos, el efecto negativo de la consanguinidad sobre la capacidad reproductiva también ha sido demostrado, principalmente en la calidad del semen y en las tasas de partos por inseminación en caballos de raza Standardbred (Van Eldik y col., 2006; Weitkamp y col., 1982). En los Países Bajos, los sementales Frisón y Shetland obtienen puntuaciones más bajas en sus parámetros de calidad del semen que los caballos de sangre caliente, presumiblemente debido a un mayor grado de consanguinidad (Boer, 2007; Parlevliet y col., 1994; Van Eldik y col., 2006). De hecho, hasta el 50% de los sementales frisonos presentados para su aprobación como sementales reproductores, son excluidos debido a una calidad espermática inadecuada (Boer, 2007). La consanguinidad también es un problema en los ponis Shetland debido a la tendencia a seleccionar un semental basándose en la altura a la cruz, el color o la

proximidad geográfica más que en el pedigrí, lo que hace más probable que los sementales se seleccionen a partir de un pequeño grupo local (Van Eldik y col., 2006). Estos animales endogámicos suelen presentar una disminución del porcentaje de espermatozoides móviles progresivos y morfológicamente normales (Van Eldik y col., 2006).

Otro factor que se asocia a la reducción de la calidad espermática es la edad (Levine y col., 2017). En los caballos, existen reportes que han descrito una tendencia a la baja en la calidad espermática con el aumento de la edad de los animales (Dowsett y Knott, 1996; Ramires Neto y col., 2013). Sin embargo, reportes que estudien la incidencia de la endogamia y la edad en la capacidad espermática del caballo son escasos (Muller-Unterberg y col., 2017).

En este capítulo se abordarán diferentes enfoques relacionados con el estudio de la calidad seminal en los caballos Pura Raza Española. Por un lado, se estudió el efecto de la consanguinidad sobre los parámetros rutinarios y cinéticos de la calidad seminal y, por otro lado, se analizó el efecto de la edad sobre dichos parámetros espermáticos. En ambos casos se utilizó la metodología asistida por análisis computacional (CASA), ya que la mayoría de los informes en los cuales se aborda esta problemática utilizan una evaluación subjetiva de los parámetros rutinarios de calidad seminal.

METODOLOGÍA

Parámetros seminales rutinarios

Para estudiar el efecto que tiene la consanguinidad y la edad sobre la calidad seminal, se evaluaron 692 eyaculados pertenecientes a 86 caballos PRE de edades que abarcaban entre 3-22 años. La colecta seminal se realizó entre los años 2007 y 2020 utilizando una vagina

artificial de tipo *Missouri*. Luego de cada colecta, el eyaculado fue filtrado para retirar el gel y la concentración total se determinó utilizando un Spermacue™ (Minitube, Alemania). En base a dichos resultados, el eyaculado se diluyó a una concentración de 40 millones de spz/ml utilizando el diluyente INRA™ para su análisis. Cada determinación fue realizada utilizando nuestros protocolos habituales de evaluación seminal para équidos.

Las muestras fueron evaluadas utilizando un software de análisis espermático asistido por computadora (Androvision™, Minitube, Alemania), observándose resultados de 3 parámetros seminales diferentes: concentración espermática (spz/ml), motilidad total (%) y motilidad progresiva (%). Para ello se realizaron al menos 2 repeticiones biológicas (microgotas de 5ul) y tres repeticiones metodológicas (3 campos analizados por gota) de cada eyaculado. Adicionalmente se determinó el volumen de cada eyaculado mediante medición directa en tubo de colección graduado.

Caracterización cinética

Por otro lado, se realizó una caracterización cinética de 557 muestras de esperma, pertenecientes a 82 caballos, de los animales mencionados anteriormente, de edades comprendidas entre 3 y 16 años. Se evaluaron cinco parámetros diferentes en seis campos distintos por muestra: velocidad de la línea curva (VCL, $\mu\text{m/s}$), velocidad de la trayectoria media (VAP, $\mu\text{m/s}$), velocidad de la línea recta (VSL, $\mu\text{m/s}$), amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza (ALH, μm) y frecuencia de cruce de latido (BCF, Hz). Tanto la colección como los análisis de cada uno de estos eyaculados fueron descritos en el párrafo anterior.

Determinación del nivel de consanguinidad

Se determinó los coeficientes de consanguinidad (F) basados en análisis de pedigrí de cada uno de los reproductores, utilizando aproximadamente 300.000 registros pertenecientes al

libro genealógico oficial de la raza PRE. La profundidad mínima del pedigrí fue de ocho generaciones completas equivalentes (ECG), permite estimar valores confiables. El cálculo se realizó mediante la metodología descrita por Wright (1931) utilizando el software Endog V4 (Gutierrez y Goyache, 2005).

Análisis estadístico

Los análisis estadísticos incluyeron un análisis de varianza (ANOVA) utilizando al semental, su edad, y la estación de colecta de semen como efectos fijos y el eyaculado como efecto aleatorio en el modelo estadístico.

En el caso del análisis cinético, con el fin de evaluar el efecto de la consanguinidad sobre la calidad espermática, los individuos se separaron en dos grupos de animales en base a su nivel de consanguinidad: alta (54 individuos, con 339 muestras de eyaculado) y baja (28 individuos con 218 muestras de eyaculado). El valor de corte que separó ambos grupos fue el coeficiente obtenido de un cruce teórico entre dos medios hermanos (12,5%), dado que cruzamientos por sobre este valor generan depresión consanguínea en varias especies (Goszczyński y col., 2018). Las diferencias entre los grupos se analizaron mediante un modelo lineal generalizado (GLM), siendo la variable dependiente los parámetros cinéticos y la categoría factorial el grupo. Los datos fueron analizados mediante un procedimiento GLM en el programa Statistica V10 (StatSoft, 2011).

RESULTADOS

Efecto de la edad sobre la calidad seminal

La edad produce un claro descenso en la concentración espermática (Figura 1.1), manifestando una correlación negativa ($r=-0.17$) y altamente significativa ($p<0.05$). Esto demuestra que los caballos más viejos producen menos esperma, probablemente por una

menor eficiencia de las células testiculares y las glándulas accesorias con el paso del tiempo. Este efecto negativo es poco notorio en animales jóvenes y mucho más significativo en animales viejos, con descensos marcados pasados los 15 años, sugiriendo una falta de linealidad en los resultados.

Efecto de la edad sobre la concentración espermática

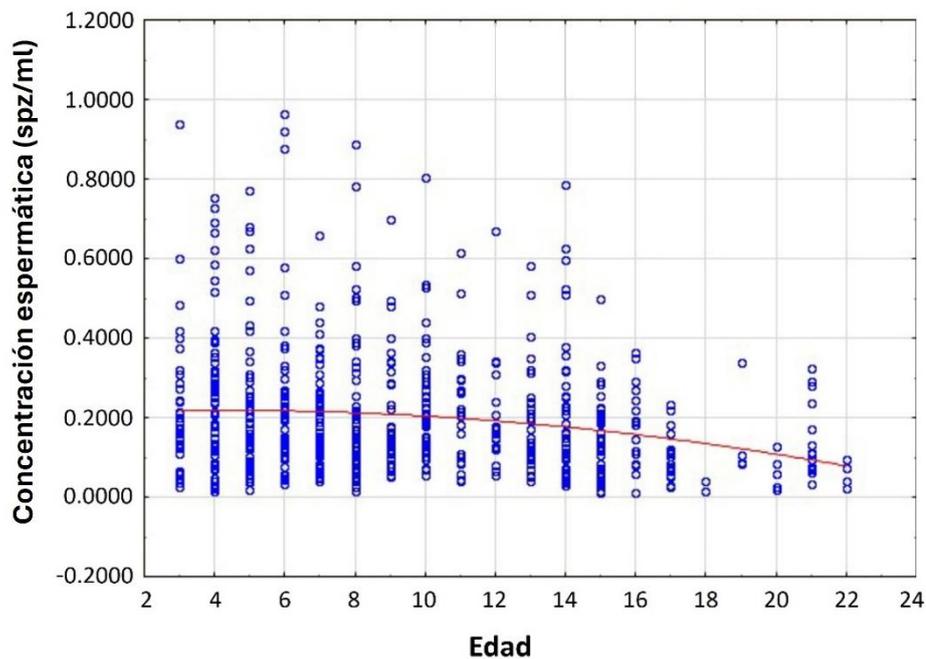


Figura 1.1. Efecto de la edad sobre la concentración espermática. En el eje X se puede ver las edades de los sementales que varía de 3 a 22 años y en el eje Y como varía la concentración espermática (spz/ml) en las diferentes edades. La línea roja representa la media de los datos.

Con respecto al volumen seminal (Figura 1.2), también se observó un efecto de la edad ($p < 0.05$). Sin embargo, en este caso, el volumen seminal aumenta de manera leve hasta los 16 años y luego comienza a decaer. Además, se observó una gran variación individual del volumen seminal entre las mismas edades. Por el contrario, para el caso de las motilidades total y progresiva, la edad no afecta a dichos parámetros de manera significativa ($p > 0,05$) siendo el semental la principal fuente de variación (Figura S1.1 y S1.2).

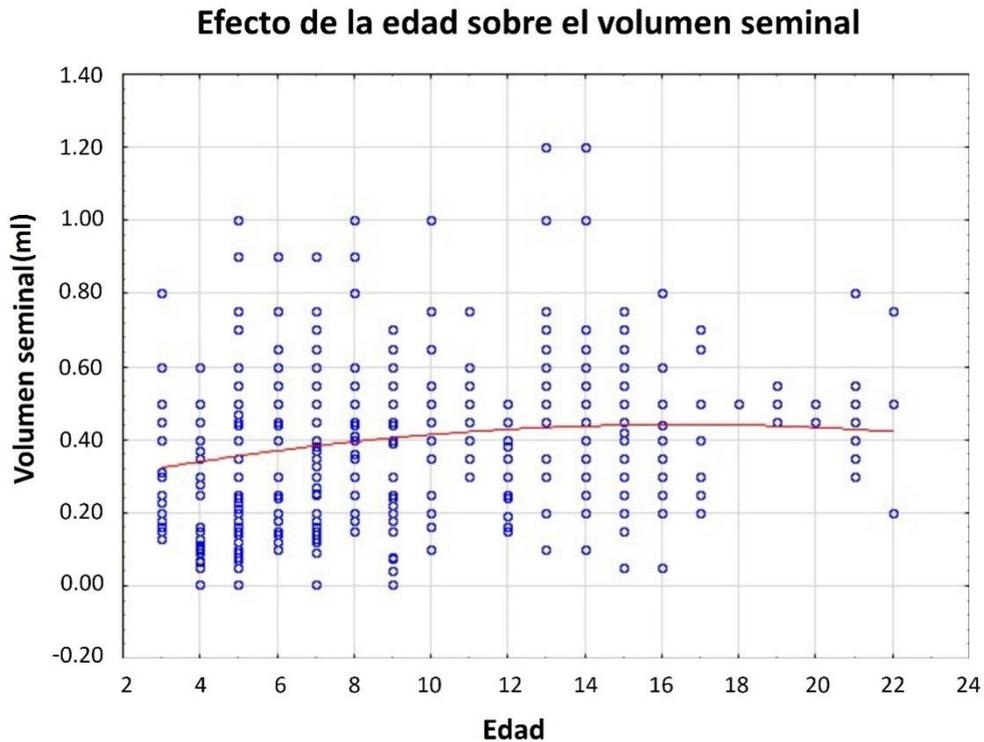


Figura 1.2. Efecto de la edad sobre el volumen seminal. En el eje X se puede ver las edades de los sementales que varía de 3 a 22 años y en el eje Y como varía el volumen seminal (ml) en las diferentes edades. La línea roja representa la media de los datos.

Por el contrario, los parámetros cinéticos no mostraron diferencias significativas ($p > 0,05$) con respecto a la edad de los sementales, es decir, la edad no influenciaría en la cinética espermática (S1.3).

Efecto de la endogamia sobre la calidad seminal

El incremento de la endogamia fue correlacionado negativamente con el volumen seminal ($r^2 = -0,14$, $p < 0,05$, Figura 1.3), el cual decrece en caballos más endogámicos. En particular, este efecto se vio exacerbado en caballos con valores de endogamia comprendidos entre 0,075 y 0,20, a partir de los cuales la curva tiende a estabilizarse.

Efecto de la endogamia sobre el volumen seminal

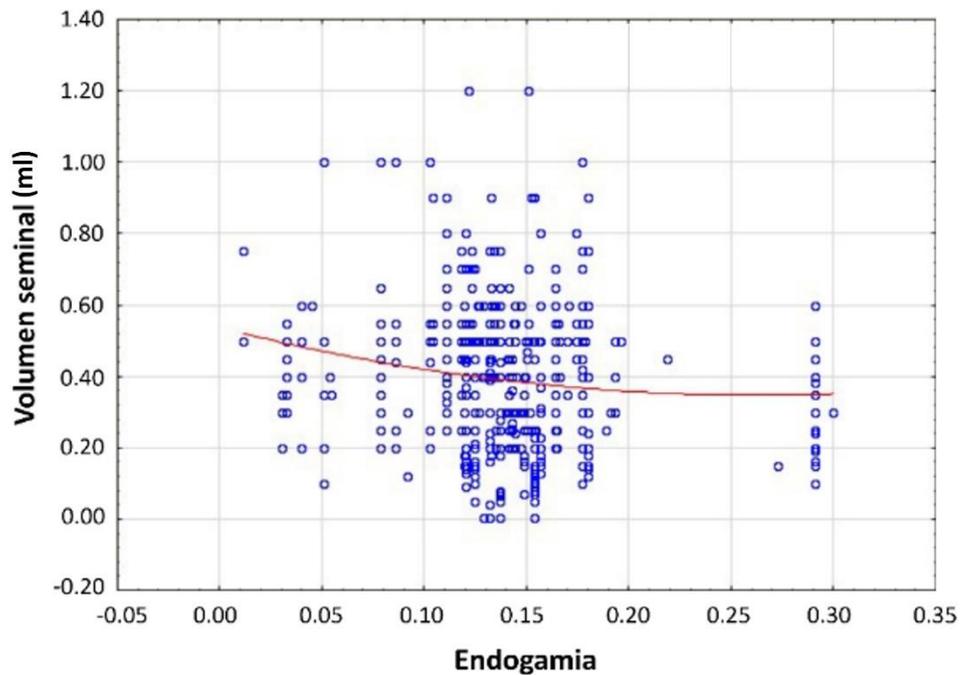


Figura 1.3. Efecto de la endogamia sobre el volumen seminal. En el eje X se puede ver los valores de endogamia y como los mismos varían en los distintos volúmenes seminales (ml). La línea roja representa la media de los datos.

La motilidad progresiva también se vio afectada por la endogamia (Figura 1.4), pero en menor medida ($p=0,033$). Se observó que los animales más endogámicos (>15%) presentan espermatozoides con una motilidad progresiva mayor que los espermatozoides de los animales con una consanguinidad más moderada.

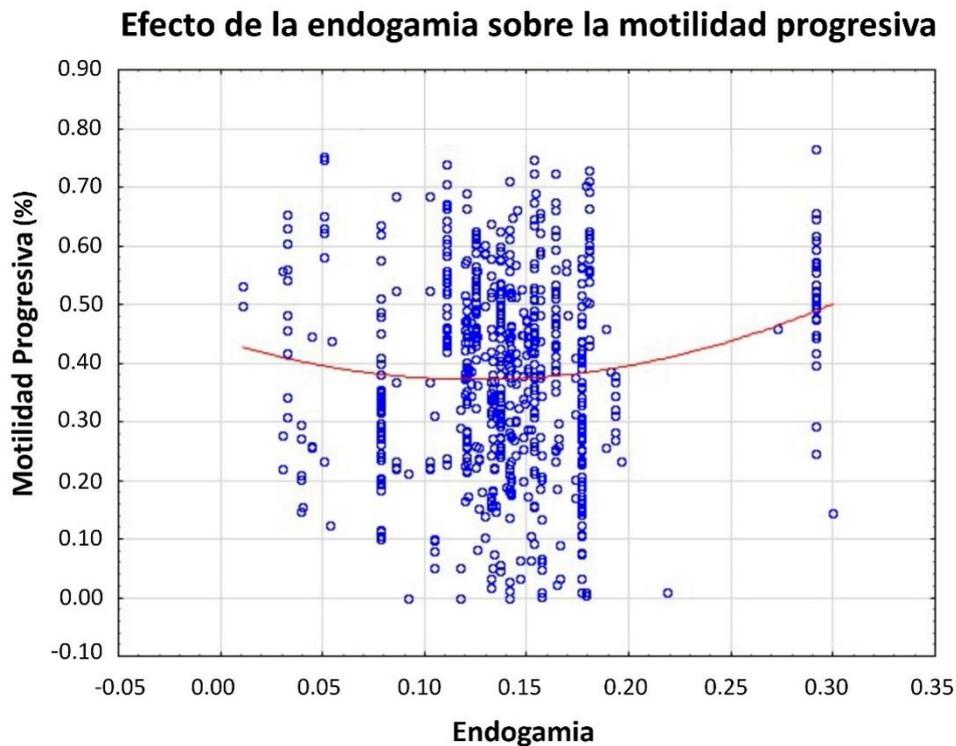


Figura 1.4. Efecto de la endogamia sobre la motilidad progresiva. En el eje X se puede ver los valores de endogamia y como la misma varía para las diferentes motilidades progresiva (%). La línea roja representa la media de los datos.

Para el caso de la motilidad total y concentración espermática, la endogamia no arrojó resultados significativos ($p > 0,05$) (S1.4, S1.5). Este resultado es adecuado, en el caso de la concentración espermática, ya que esta suele estar afectada por el manejo del semental. Sin embargo, en el caso de la motilidad, la falta de efecto de la endogamia puede verse explicada por la gran variabilidad encontrada entre los diferentes eyaculados de los mismos animales.

Cuando se analizó el efecto de la consanguinidad sobre estos parámetros cinéticos (Tabla.1.1), obtuvimos que los parámetros VAP, VCL y AHL fueron menores en los animales altamente consanguíneos que en los que presentaban baja consanguinidad ($p < 0,05$), lo que

sugiere una menor velocidad y amplitud del desplazamiento de la cabeza. En el caso de la BCF, no se observaron diferencias significativas ($p>0,05$) entre los dos grupos de estudio.

Variables	Grupos	N	Media	Mínimo	Máximo	Desvió Estándar
VAP	Baja	218	57,12 ^A	30,39	107,41	14,944
VCL	Baja	218	114,07 ^B	56,08	221,90	29,123
VSL	Baja	218	41,74 ^c	19,24	91,68	12,484
ALH	Baja	218	3,51 ^D	1,75	6,43	0,770
BCF	Baja	218	23,42 ^e	13,71	34,73	4,479
VAP	Alta	339	55,54 ^A	30,06	110,21	13,904
VCL	Alta	339	109,95 ^B	57,011	201,58	26,640
VSL	Alta	339	42,98 ^c	21,54	86,02	11,982
ALH	Alta	339	3,26 ^D	1,33	5,22	0,738
BCF	Alta	339	24,18 ^e	12,75	36,02	4,568

Tabla. 1.1 Efecto del aumento de la endogamia sobre los parámetros de motilidad espermática. Se observan los valores de las medias de los diferentes parámetros cinéticos en animales con alta y baja endogamia. La letra en mayúscula indica diferencias significativas ($p<0,05$), las letras en minúscula indican que no hay diferencias significativas ($p>0,05$)

DISCUSIÓN

Las características reproductivas de los caballos, como de otras especies, son influenciadas por varios factores. En este capítulo abordamos el efecto que tiene la consanguinidad y la edad sobre la calidad seminal en caballos Pura Raza Española. Nuestros resultados indicaron que los parámetros rutinarios determinados en un análisis espermático fueron afectados por la edad y la endogamia (en algunos casos), mientras que los parámetros cinéticos no.

Se ha señalado que la producción de espermatozoides se encuentra influenciada por la edad del animal, el régimen de colecta, el año y la temporada, así como por el método de recolección y el componente genético del animal (Parlevliet y col., 1994). En nuestro caso, todos los animales fueron colectados en la misma instalación utilizando el mismo método.

No se detectaron efectos significativos de la temporada reproductiva, ni del régimen de colecta, mientras que si se observaron efectos propios del animal. Por otro lado, tanto la edad como el aumento de la endogamia sí que afectaron significativamente la calidad espermática de los animales. Nuestros resultados concuerdan con varios estudios realizados por diferentes autores (Atroshchenko y col., 2019); DowsettyKnott (1996); Goncalves y col. (2023), los cuales estudiaron el efecto de la edad sobre las características seminales en diferentes razas y observaron que la concentración de semen disminuye en animales adultos y gerontes. En nuestro caso, el descenso fue mucho más notorio en animales mayores a los 15 años, cuando el descenso del volumen y de la concentración fue más evidente. En un estudio previo, Adamou y col. (2012) estudiaron el efecto de la edad sobre la concentración espermática y volumen seminal en caballos Pura Raza Española, comparando animales jóvenes (3-5 años) y animales adultos (8-14 años). Sus resultados demostraron que la concentración espermática aumentaba en caballos más jóvenes, mientras que disminuía el volumen seminal, siendo inversamente proporcional en caballos adultos. Nuestro trabajo difiere de estos resultados, ya que, observamos que la concentración se mantenía constante en animales más jóvenes y disminuida en animales gerontes. Sin embargo, había un incremento del volumen seminal en animales más jóvenes, el cual aumentaba la producción total de espermatozoides (volumen x concentración). En un trabajo reciente, Goncalves y col. (2023) detectaron una relación cuadrática y positiva entre el volumen seminal y la edad en caballos Lusitanos. Sus resultados demostraron un incremento volumétrico hasta los 15 años, en nuestro caso el volumen seminal también se fue incrementando hasta una edad similar, para luego comenzar a decaer. Cabe aclarar que ambos estudios antes mencionados no evaluaron caballos de más de 15 años, por lo cual el realizar comparaciones es imposible. Sin embargo, tanto los resultados del trabajo mencionado, como los obtenidos en este

estudio sugieren que la producción máxima de espermatozoides podría alcanzarse a edades cercanas a los 15 años, para luego ir disminuyendo gradualmente.

Por otro lado, la edad no tuvo influencia con respecto a la motilidad seminal. Este resultado coincide con el trabajo de Adamou y col. (2012). Sin embargo Goncalves y col. (2023) observaron un aumento de la motilidad a medida que el animal crece hasta llegar a los 15 años en caballos Lusitanos. En este sentido, es bien conocido el hecho que la motilidad seminal es uno de los parámetros que son afectados negativamente por la edad, pero luego de cierto valor de umbral, siendo 5 a 13 años significativamente mayor en comparación con sementales más jóvenes y seniles (Abah y col., 2023). Si bien este valor puede ser el mismo que para el volumen espermático en equinos, no existe un valor claro a partir del cual podría comenzar a verse un efecto negativo. En todo caso, nuestros resultados sugieren que este valor de umbral depende de la raza, ya que no fue posible encontrarlo en PRE. Sin embargo, el hecho que la cantidad de caballos gerontes analizados sea bajo, podría haber influido en este parámetro. Por tal motivo, se debe continuar estudiando esta variable en Pura Raza Española, para confirmar los resultados obtenidos.

Las variables cinéticas tampoco fueron afectadas por la edad en el estudio realizado por PRE. Este tópico en particular ha sido muy poco estudiado en caballos, ya que la mayoría de los trabajos poblacionales realizados utilizan estudios de centro de reproducción en los cuales el análisis de calidad espermática es solo subjetiva. Sin embargo, Aitken y col. (2023) estudiaron la preñez a partir de eyaculados provenientes de sementales de edades que iba entre 4 y 18 años, en los cuales también se evaluó los 3 patrones cinéticos (VAP, VSL, VCL). Sus resultados fueron similares a los obtenidos en nuestro estudio, siendo que no observaron variación de los valores de los parámetros en los diferentes individuos con el

paso de los años. Esto sugiere fuertemente que la pérdida de calidad seminal esta más explícita por la pérdida de motilidad y volumen que por una peor calidad del movimiento de los espermatozoides.

Con respecto a la endogamia nuestros resultados determinaron que tanto los parámetros rutinarios como cinéticos, se ven afectados negativamente por la misma. El impacto negativo de la endogamia, en particular sobre los rasgos reproductivos se conoce desde hace mucho tiempo y se cree que se deriva de la reducción de la heterocigosidad en las poblaciones endogámicas, lo cual incrementa la presencia de genotipos homocigóticos, relacionados con alelos recesivos deletéreos (Khatib, 2015). El efecto exacto de la consanguinidad sobre diferentes rasgos seminales en caballos no se conoce bien (Sairanen y col., 2009), pero algunos autores han informado de que incrementos en los coeficientes de consanguinidad se asociaban con una menor motilidad de los espermatozoides en ponies (Van Eldik y col., 2006) y caballos Sorraia (Gamboa y col., 2009). Otros autores por el contrario no han encontrado una influencia significativa (B.J. Ducro, 2011). Esto puede deberse a que niveles altos de consanguinidad pueden afectar a la gametogénesis, la función endocrina (producción de andrógenos y gonadotropina), el transporte de esperma, la producción de líquido seminal, entre otros (Dini y col., 2020; Losdat y col., 2014; Müller-Unterberg y col., 2017).

En nuestros estudios se demostró una correlación negativa entre el coeficiente de consanguinidad y el volumen del eyaculado, observándose una marcada disminución cuando el F se situaba entre el 7 y el 20%. Resultados similares fueron reportados por Van Eldik y col. (2006), quienes estudiaron el volumen seminal en la raza ponies Shetland. De la misma manera Betancur y col. (2023), analizaron el volumen seminal en Caballos Criollos

Colombianos y notaron tendencia hacia el descenso del volumen seminal en los animales más consanguíneos. Con respecto a la motilidad solo observamos una correlación negativa leve en los espermatozoides progresivos, pero no así en los motiles totales. Estos resultados coinciden con Van Eldik y col. (2006) y Dini y col. (2020), quienes hallaron que el aumento de los coeficientes de consanguinidad en los ponis Shetland se correlacionaba con menores índices de motilidad progresiva. Asimismo, Betancur y col. (2023) obtuvieron los mismos resultados en Caballos Criollos Colombianos, demostrándonos que la consanguinidad afecta a esta variable independientemente del efecto raza. Respecto a las variables de motilidad total y concentración espermática, nuestros resultados demostraron que las mismas no se vieron afectadas por la depresión endogámica. Betancur y col. (2023) al igual que nosotros no observaron diferencias significativas en la concentración espermática, sin embargo ellos obtuvieron diferencias significativas en los motiles totales. La falta de efecto de la endogamia sobre los motiles totales en nuestro trabajo puede deberse a la gran variabilidad encontrada entre los diferentes eyaculados de los mismos individuos.

Con relación a la endogamia con respecto a los parámetros cinéticos, nosotros observamos diferencias significativas en los animales con alta consanguinidad respecto a las variables relacionadas a la velocidad (VAP y VCL) y a la amplitud del desplazamiento (ALH) del espermatozoide. Los autores Betancur y col. (2023) solo analizaron las variables velocidad en los caballos criollos colombianos y obtuvieron diferencias significativas para el VCL, al igual que nosotros, pero para las otras dos variables no observaron diferencias. Se realizó una exhaustiva búsqueda bibliográfica respecto a los parámetros analizados por el CASA en caballos Pura Raza Española y su relación con la endogamia y no se encontró información sobre la misma. Se realizaron estudios similares en toros Retinta y al igual que nosotros,

Dorado y col. (2017) observaron que, de todos los parámetros derivados del CASA, solo 4 se vieron afectados por la consanguinidad: las variables velocidad (VCL, VSL y VAP) y amplitud del desplazamiento (ALH). Independientemente de la raza o especie, estos resultados, nos demuestran que altos niveles de consanguinidad pueden comprometer gravemente la calidad espermática, lo que posteriormente, puede tener una influencia negativa en la fertilidad.

FIGURA SUPLEMENTARIA

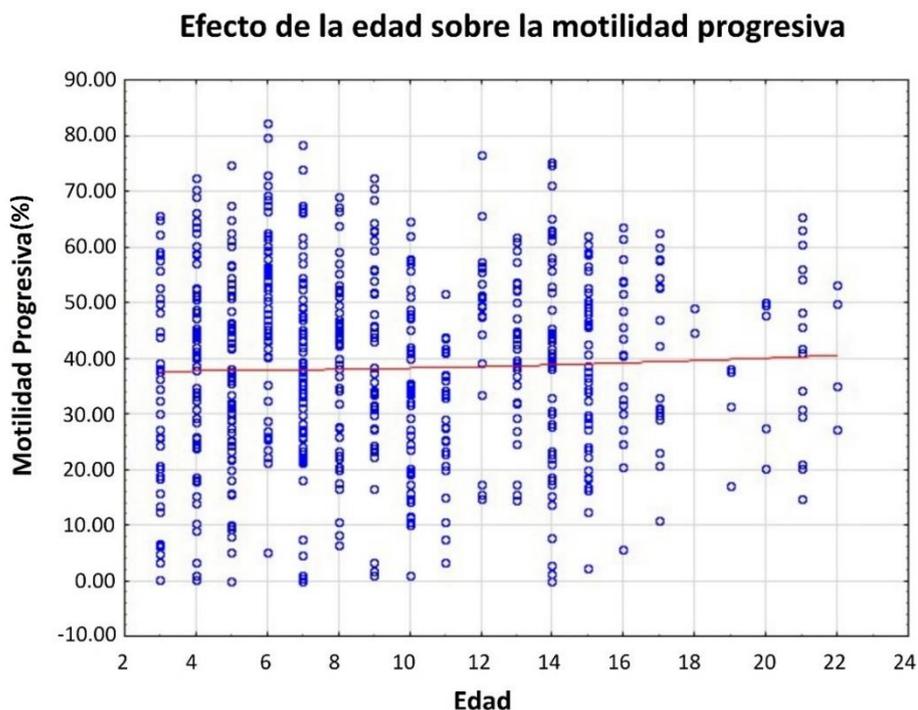


Figura S1.1. Efecto de la edad sobre la motilidad progresiva. Se puede observar los valores de variación de la motilidad progresiva (%) en los espermatozoides de 3 a 22 años. La línea roja representa la media de los datos.

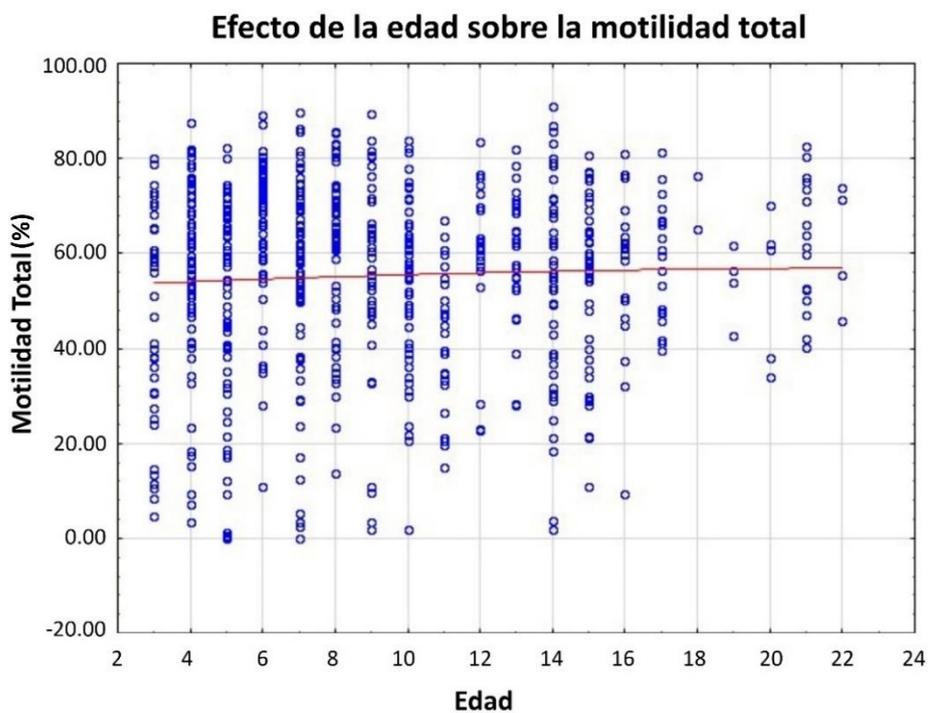


Figura S1.2. Efecto de la edad sobre la motilidad total. Se puede observar los valores de la motilidad total (%) en las diferentes edades de los espermatozoides. La línea roja representa la media de los datos.

Efecto de la motilidad espermática sobre la edad de los caballos

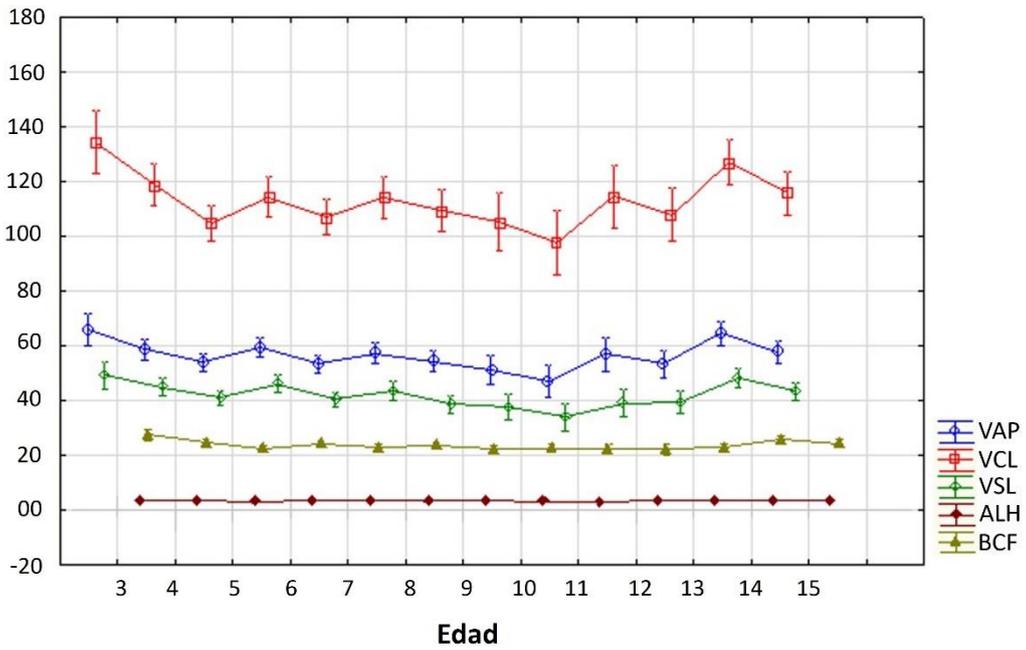


Figura S.1.3 Efecto de la edad sobre los parámetros cinéticos espermáticos. En el eje X se puede ver los animales con edades que van entre 3 a 16 años y la relación que hay con los parámetros cinéticos seminales.

Efecto de la endogamia sobre la motilidad total

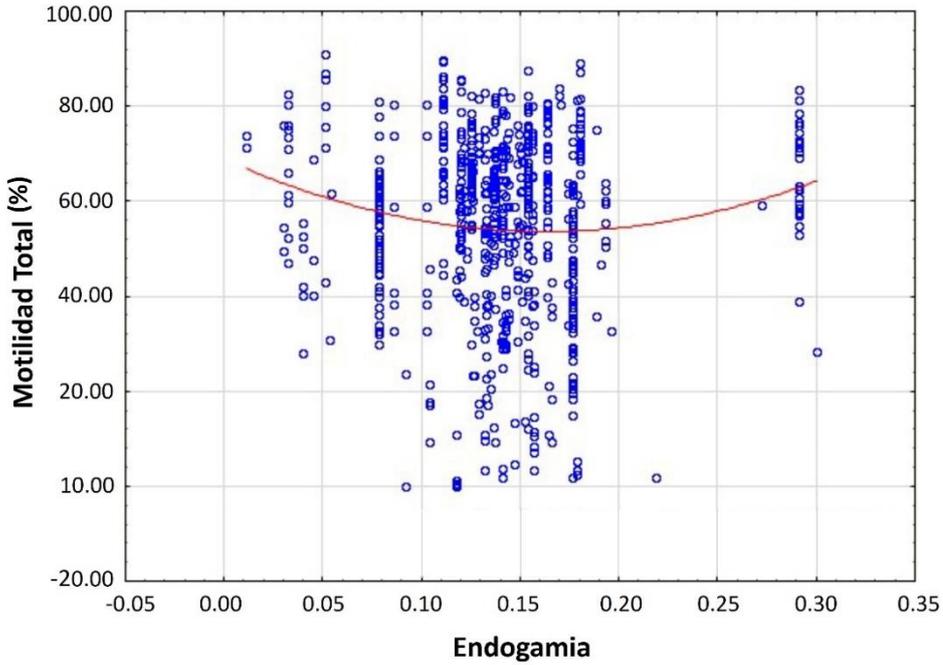


Figura S1.4. Efecto de la endogamia sobre la motilidad total. Se observa la motilidad total (%) en los distintos valores de endogamia. La línea roja representa la media de los datos.

Efecto de la endogamia sobre la Concentración espermática

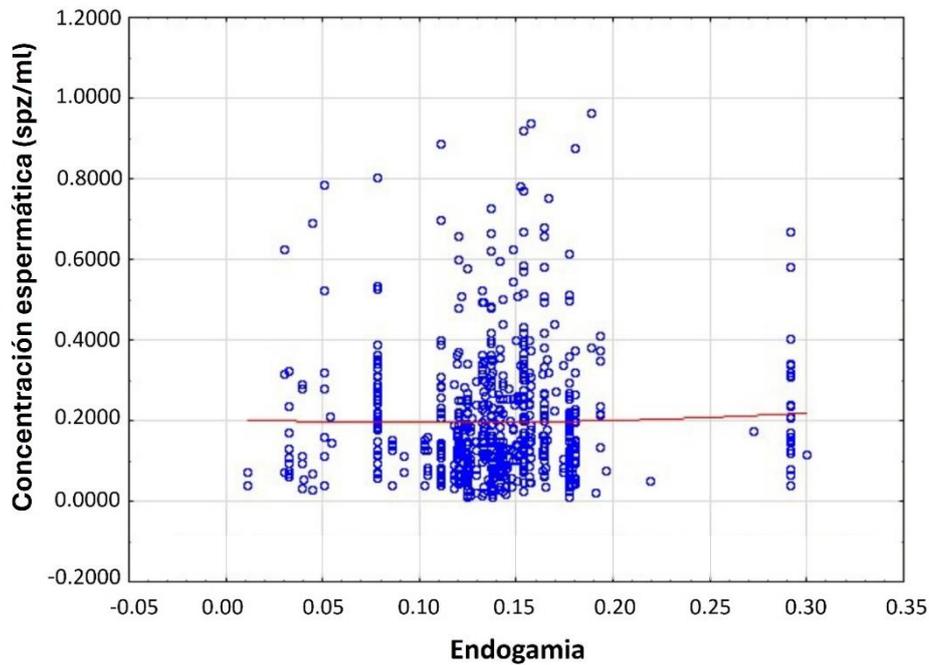


Figura S1.5. Efecto de la endogamia sobre la concentración espermática. Se puede ver la concentración espermática (spz/ml) en los diferentes niveles de endogamia. La línea roja representa la media de los datos.

CAPÍTULO II: IMPACTO DE LA CONGELACIÓN Y EL DILUYENTE EMPLEADO EN EL PATRÓN DE SUBPOBLACIONES ESPERMÁTICAS EN SEMENTALES EQUINOS

INTRODUCCIÓN

El caballo moderno, posiblemente la especie doméstica menos afectada por la selección natural en términos de fertilidad (Laseca y col., 2022), ha sido objeto de procesos selectivos principalmente centrados en características morfológicas y funcionales, relegando la atención sobre su capacidad reproductiva. Si bien dicho carácter es considerablemente menos eficiente en caballos en comparación con otras especies domésticas (Perdomo-Gonzalez y col., 2021), esta habilidad de producir progenie de manera eficiente y adecuada sigue siendo un factor crítico para la rentabilidad en muchas de las razas y explotaciones equinas (Gomez y col., 2020). En este sentido, se ha demostrado que tanto los machos (Griffin y col., 2019) como las hembras (Laseca, y col., 2022) juegan un rol importante en la mejora de la fertilidad. Sin embargo, la fertilidad de las hembras es mucho más complicada de cuantificar, sobre todo en términos poblacionales, que la de los machos, que está íntimamente ligada a su calidad seminal y capacidad de congelación (Wilson y col., 2019).

La evaluación *in vitro* de la calidad seminal juega un papel crucial en la valoración del potencial de fertilidad de los machos antes de su uso en programas de inseminación artificial en diversos animales (Valverde y col., 2016). En caballos, este tema tiene un interés particular, impulsado por las notables variaciones observadas entre diferentes sementales

(Loomis y Squires, 2005), pero también por el aumento de la adopción de la inseminación artificial en las prácticas de cría de algunas razas, en las cuales el semen debe ser desplazado entre diferentes locaciones, o bien como dosis congeladas o refrigeradas (Gottschalk y col., 2016).

Históricamente, la motilidad y la morfología espermáticas (esta última en menor medida) han sido los parámetros seminales predominantes utilizados en la evaluación de la fertilidad (Griffin y col., 2019). Sin embargo, durante los últimos 20 años, la introducción de los sistemas de análisis espermático asistido por computadora (CASA) ha revolucionado el análisis del semen al proporcionar una visión más objetiva de las características cinemáticas y morfométricas del eyaculado de los animales (Whitesell y col., 2020). El uso de CASA, además, no solo permite evaluar en conjunto un elevado número de espermatozoides, lo cual brinda datos de motilidad más objetivos en un único análisis, sino que también genera una caracterización individual del movimiento de cada espermatozoide y sus trayectorias. Esta última posibilidad genera un voluminoso *dataset* en el cual quedan registrados una serie de parámetros cinéticos para cada célula, en cada uno de los eyaculados (muestras seminales) analizados. Si bien estos resultados pueden ser altamente informativos, se ha demostrado que los análisis estadísticos convencionales basados en valores medios y desviaciones estándar a menudo no son capaces de capturar las diferencias existentes entre individuos y eyaculados de manera adecuada, ya que no tienen en cuenta la variabilidad inherente dentro de la muestra del semen (Ramón y col., 2014). Para abordar este desafío, la utilización de técnicas de agrupación estadística, comúnmente conocida como “análisis de subpoblaciones”, ha surgido como un enfoque prometedor para capturar todo el espectro de variabilidad presente dentro de los eyaculados de un individuo (Ramón y Martínez-

Pastor, 2018). Utilizando este enfoque, se ha logrado mejorar la comprensión de la diversidad de espermatozoides dentro de un eyaculado dado, pero también se ha detectado presuntas asociaciones entre dicha variabilidad individual y el potencial de fertilidad de los machos.

Varias especies, incluyendo a los bovinos (García-Herreros y Leal, 2014), ovinos (Martí y col., 2011), porcinos (Gil y col., 2009), y felinos (Gutiérrez-Reinoso y García-Herreros, 2016), entre otras, han utilizado el análisis de subpoblaciones tanto en semen fresco y congelado. En todos los casos, estos análisis se basan en determinar los patrones de movimiento preponderantes en cada muestra. Asimismo, ha sido demostrado que los patrones de subpoblaciones de un animal pueden verse afectados por el proceso de criopreservación (Bubeníčková y col., 2020; Ortega-Ferrusola y col., 2009). Por tal motivo, examinar los efectos de criopreservación en la estructura cinemática de las subpoblaciones de espermatozoides puede aumentar nuestra comprensión de cómo su manipulación impacta en la calidad del semen, así como de la tolerancia de los espermatozoides a los procedimientos de criopreservación (Barbas y col., 2018). Esto podría tener importantes implicaciones económicas, ya que un mejor análisis de semen podría conducir a la comercialización de dosis de semen equino que ofrezcan mayores garantías de calidad (Quintero-Moreno y col., 2003). Pero más aun en el caballo, cuya capacidad de criopreservación seminal depende en gran medida del semental, habiendo animales que presentan buenas tasas de congelabilidad, mientras que otros presentan valores inaceptables (McCue, 2014).

Por lo mencionado anteriormente el objetivo principal del presente capítulo fue identificar variaciones en subpoblaciones cinéticas de espermatozoides en semen fresco y congelado

de caballos de Pura Raza Española. Además, investigamos el efecto de diferentes diluyentes y tiempos sobre estas subpoblaciones y cómo se ven afectadas por la criopreservación.

METODOLOGÍA

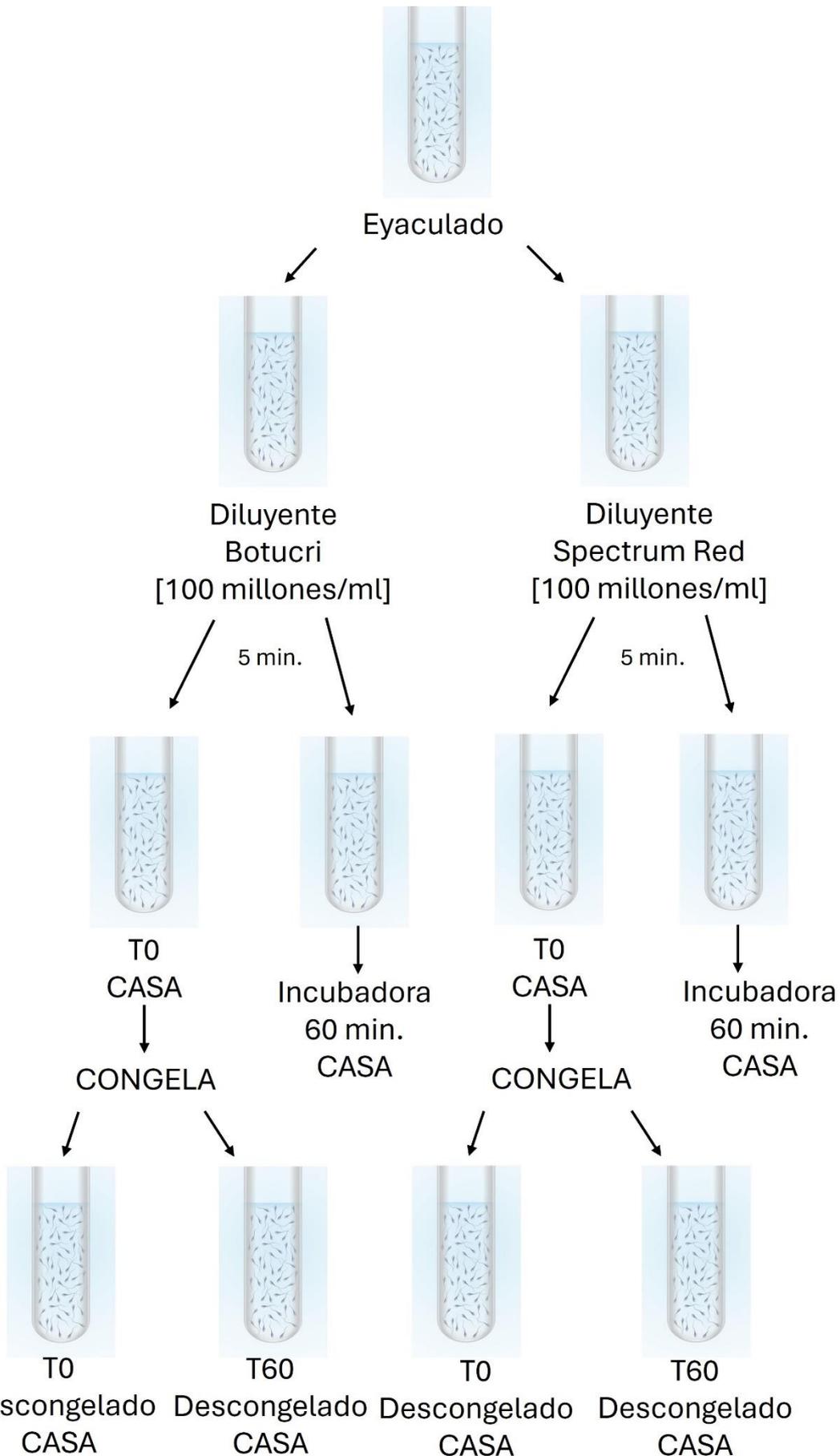
Recolecta de semen

Se colectaron muestras de semen de 18 sementales de pura raza española, de edades comprendidas entre 6 y 14 años, en el Centro Nacional de Referencia Equina (CENRE), ubicado en Jerez de la Frontera (España). Las colectas se realizaron en otoño utilizando una vagina artificial Missouri (Minitüb, Tiefenbach, Alemania) sobre un maniquí de monta. Se realizaron dos colectas separadas con un intervalo de 7 días entre ellas. Antes del estudio, los animales fueron “limpiados” reproductivamente realizando dos colectas de semen diarias durante 7 días consecutivos, para estandarizar la eyaculación diaria de espermatozoides.

Diseño experimental

El diseño experimental tuvo como objetivo determinar la incidencia de la congelación y el diluyente en las dinámicas cinéticas de los espermatozoides equinos a lo largo del tiempo. Para ello, el primer paso fue dividir la muestra seminal post-eyaculado en dos alícuotas iguales en volumen. Una de ellas se diluyó utilizando un diluyente comercial Botucríó™ (Botupharma, Brasil), mientras que la otra se diluyó utilizando un diluyente comercial Spectrum Red SBS Cryosystem™ (Minitube, España). En ambos casos la dilución final fue de 100 millones de spz/mL. Luego de 5 minutos de equilibración, cada alícuota fue nuevamente dividida en dos partes iguales. Una de ellas se mantuvo en incubación por 60 min. en estufa

a 37°C y la otra fue inmediatamente congelada empleando el protocolo que se describirá a continuación. Cabe aclarar que las dos diluciones que fueron congeladas (una por diluyente), fueron incluidas en el mismo *batch* de congelación. Posteriormente, las dos alícuotas frescas se evaluaron cinéticamente mediante CASA a los 5 y 60 minutos post-dilución. Para finalizar, dos pajuelas de cada combinación individuo/diluyente fueron descongeladas, sumergiéndose en agua a 37,5°C durante 60 segundos. Las dosis fueron luego puestas a incubar en estufa a la misma temperatura y evaluadas cinéticamente a los 5 y 60 minutos post-descongelado. Este procedimiento se llevó a cabo a los 90 días del proceso de congelación aproximadamente. En total, se realizaron 16 análisis por semental, considerando dos eyaculados, dos diluyentes (BT y MR) y muestras frescas y congeladas en dos puntos temporales (t0 y t60). El esquema 2.1 sintetiza gráficamente el diseño experimental.



Esquema. 2.1. Diseño experimental. Se esquematiza los pasos realizados para el diseño experimental que incluyen, las diluciones con los diluyentes, tiempo de incubación y medición con el CASA.

Congelación de esperma

El protocolo general de congelación espermática incluyó una centrifugación inicial (500g, 10 min.) en tubos de 50ml, para obtener la fracción libre de plasma seminal. Luego, la concentración del eyaculado se determinó utilizando el módulo de concentración del software Androvision™ (Minitube, España). Posteriormente, el eyaculado se dividió de acuerdo con el protocolo experimental detallado en el punto anterior (diseño experimental). Aquellas muestras destinadas a la congelación fueron envasadas en pajuelas plásticas de 0,5mL (Minitüb España). Luego, las muestras fueron procesadas en un congelador automatizado IceCube 14S (Minitube, España) utilizando la rampa de congelación estandarizada para el centro: descenso de 20°C a 5°C a 3°C/minuto y de 5°C a -140°C - 25°C/minuto. Finalizado el proceso, las pajuelas fueron sumergidas en nitrógeno líquido (N₂) en termos específicos, en donde fueron mantenidas por al menos 90 días previos a su descongelado y análisis.

Análisis cinético de los eyaculados

La evaluación cinética de los eyaculados se realizó utilizando el sistema informático Androvision™, de acuerdo con el protocolo experimental. El análisis se realizó en portaobjetos precalentados en platina térmica (a 37°C), sobre los cuales se depositaron dos alícuotas de 5 µl del eyaculado previamente diluido. Cada gota fue cubierta con un cubreobjetos de 24x24mm generando una cámara de evaluación (debido a la tensión superficial) de 8,7 µm de altura aproximadamente. Ambas cámaras fueron dejadas estabilizar por 1 minuto (aproximadamente) directamente sobre la platina calefaccionada de la plataforma de análisis (montada sobre un microscopio Motic™), tras lo cual fueron evaluados al menos tres campos ópticos de cada una de las cámaras de conteo. En cada una

de ellas, el software registró 3 parámetros de velocidad espermática (velocidad curvilínea (VCL), velocidad rectilínea (VSL), velocidad de trayectoria media (VAP), tres índices compuestos (linealidad (LIN), rectitud (STR) y oscilación (WOB) y dos parámetros asociados al movimiento de la cabeza del espermatozoide (amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza (ALH) y frecuencia de cruce de latidos (BCF). En total se analizaron al menos 300 espermatozoides de cada eyaculado/dilución/tiempo.

Agrupación de subpoblaciones

Los patrones de movimiento de cada uno de los eyaculados, y como fueron afectados por los tratamientos se determinaron mediante un análisis discriminante de agrupación jerarquizado (análisis de subpoblaciones) utilizando la metodología descrita por Martínez-Pastor y col. (2005). En primer lugar, se aplicó un análisis de componentes principales (PCA) para reducir la dimensionalidad del conjunto de datos, pero conservando al mismo tiempo la máxima cantidad de información de las variables originales. A partir de estos resultados, se seleccionaron los primeros dos componentes que explicaban aproximadamente el 80% de la variabilidad de los datos y se identificaron las variables que mejor representaban estos componentes en función de sus puntuaciones estadísticas. A partir de ellas, se realizó un análisis de “*clustering*” no jerárquico mediante el método Kmeans que utiliza la distancia euclidiana para calcular el centro de cada *cluster*, identificando los grupos iniciales. Por último, se realizó un análisis jerárquico de los grupos obtenidos en el paso anterior, empleando el método de Ward (menos varianza estadística), para obtener el número final de *cluster*, luego se asignó cada espermatozoide a una de las tres subpoblaciones determinadas.

Análisis estadístico

Las diferencias en las proporciones de las subpoblaciones espermáticas entre tratamientos (diluyente y tiempo) se estimaron independientemente en muestras frescas y congeladas mediante un modelo lineal general (GLM) y una prueba post hoc de Tukey. Se utilizó como variable dependiente las proporciones de las subpoblaciones y como factores el diluyente y tiempo. Además, el efecto de la congelación sobre las subpoblaciones dentro de los tratamientos se estimó mediante una prueba Z, con un umbral de significación fijado en 0,05. Todas las estimaciones se realizaron en el entorno estadístico R V4.2.3 (R-Core-Team, 2023).

RESULTADOS

Tratamiento de datos y agrupación de subpoblaciones

En primer lugar, se determinó la viabilidad de cada eyaculado para el análisis, estimando la motilidad total de la muestra. Dos eyaculados pertenecientes a dos individuos diferentes mostraron una motilidad total inferior al 60% tras la recogida, por lo que fueron descartados, conservándose 34 muestras para el análisis posterior. En total se caracterizaron cinéticamente 253.190 spz, con un promedio de 465 spz por cada combinación de eyaculado/diluyente/tiempo/tratamiento para cada animal.

El análisis PCA mostró que tres variables (VCL, VAP y ALH) eran las más informativas, tanto en muestras frescas como congeladas, para realizar el análisis de subpoblaciones; el cual demostró la existencia de 3 subpoblaciones bien definidas en función de sus patrones cinéticos: Sp1 (spz de progresión lenta y lineal), Sp2 (spz con movimientos de tipo

hiperactivo) y Sp3 (spz de progresión rápida y lineal). Finalmente, cada espermatozoide fue asignado a una de estas 3 subpoblaciones. En la tabla 2.1, se muestran el número de espermatozoides incluidos en cada subpoblación y las distribuciones de las subpoblaciones en eyaculados frescos y congelados (Tabla 2.1).

VALORES DE PARÁMETROS CINÉTICOS ARROJADOS POR EL CASA

HC	FRESCO			CONGELADO		
	Sp1	Sp2	Sp3	Sp1	Sp2	Sp3
	LENTOS PROGRESIVOS	HIPERACTIVOS	RAPIDO PROGRESIVOS	LENTO PROGRESIVOS	HIPERACTIVOS	RAPIDO PROGRESIVOS
n	79487	17835	74403	65859	12161	45664
%	46.3	10.4	43.3	53.2	9.83	36.9
VCL	37.91±20.65	230.50±29.78	140.70±31.28	59.97±26.74	202.66±32.33	148.67±31.71
VSL	17.93±9.12	85.03±33.64	58.01±23.16	25.41±16.35	80.04±23.82	76.81±24.33
VAP	20.789±8.77	105.63±25.90	67.60±20.43	29.15±15.32	93.83±19.65	81.87±22.10
LIN	0.56±0.27	0.37±0.13	0.42±0.14	0.43±0.21	0.40±0.10	0.521±0.14
STR	0.85±0.20	0.79±0.19	0.84±0.16	0.82±0.21	0.85±0.16	0.93±0.11
WOB	0.62±0.22	0.46±0.09	0.48±0.11	0.50±0.171	0.46±0.07	0.56±0.12
ALH	0.47±0.26	2.67±0.54	1.60±0.45	0.64±0.25	2.20±0.40	1.21±0.32
BCF	12.84±6.97	18.08±6.52	19.99±7.67	19.89±9.65	22.00±6.98	28.54±9.51

Tabla. 2.1. Valores de parámetros cinéticos arrojados por el CASA. Se observa los valores de las medias de los parámetros cinéticos espermáticos correspondientes a las 3 subpoblaciones: Lentos progresivos (Sp1), Hiperactivos (Sp2) y Rápidos progresivos (Sp3) para las muestras frescas y congeladas.

Caracterización cinética de las subpoblaciones

La subpoblación Sp1 (lenta progresiva) se caracterizó por bajas velocidades (VAP, VCL y VSL), actividad flagelar intermedia (BCF), pero altos valores de LIN y STR, junto con un bajo ALH.

La subpoblación Sp2 (hiperactiva) se identificó con valores muy altos de velocidad (VAP, VCL y VCL), con actividad flagelar media/alta (BCF), amplitud de desplazamiento de la cabeza muy alta (ALH) y valores bajos de trayectoria y linealidad (LIN, STR y WOB). Por último, la subpoblación Sp3 se definió como rápido y progresivo, presentando valores altos de

velocidades (VAP, VCL y VSL), con una actividad flagelar media/alta (BCF) y una trayectoria y linealidad altas (LIN, STR y WOB), junto con un valor medio de ALH.

Efecto del diluyente con respecto al tiempo sobre las subpoblaciones espermáticas en muestras frescas y congeladas

Las figuras 2.1, 2.2 y 2.3 muestran los resultados del análisis de GLM, donde se calculó la interacción diluyente-tiempo para las muestras en fresco por un lado y las muestras en congelado por el otro[#].

Para la Sp1 se observaron diferencias en las muestras congeladas en las variables diluyente y tiempo y en la interacción diluyente-tiempo (Figura 2.1). Con respecto a los diluyentes, se observaron diferencias significativas ($p < 0,01$), el BT presentó menos proporción de espermatozoides lentos en comparación con MR en ambos tiempos: en t0 (43% vs 62%) y t60 (60% vs 67%). Para la variable tiempo, también se observaron diferencias significativas ($p < 0,01$), aumentó la proporción de lentos de t60 con respecto a t0 para BT (60% vs 43%) y MR (67% vs 62%). Con respecto a la interacción diluyente-tiempo, se observaron diferencias significativas ($p < 0,01$); la prueba de Tukey (post-hoc) mostró que a t0 (43%) las muestras diluidas en BT presentaron un porcentaje menor de Sp1 en comparación con MR (62%); similarmente a t60 las muestras diluidas en BT presentaron un porcentaje menor de Sp1 (61%), en comparación con MR (67%) (Figura 2.1). En las muestras en fresco no se observaron diferencias significativas en ninguna variable de estudio ($p > 0,05$).

[#] Si bien los análisis de GLM se realizaron de manera individual para las muestras en fresco y congelado, las mismas se graficaron en conjunto, con el fin de evitar excesos de gráficos en el capítulo. Los símbolos en círculo corresponden a las muestras en fresco y los triángulos hace referencia a las muestras en congelado.

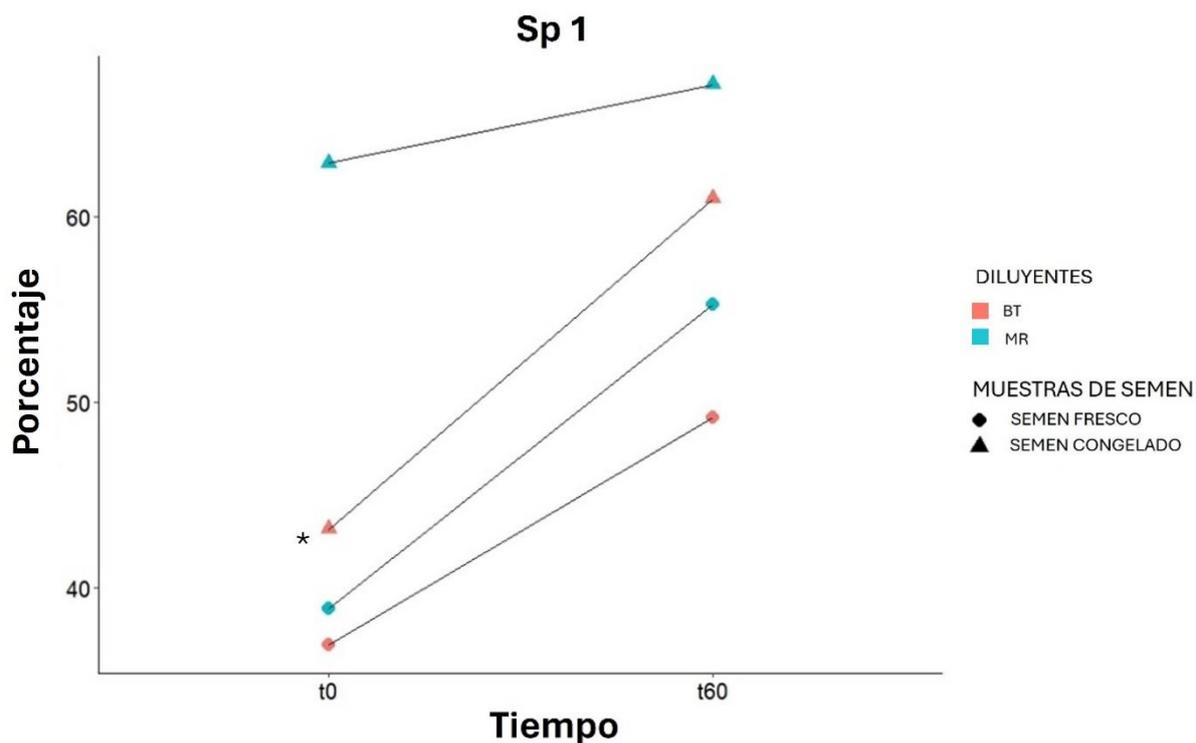


Figura. 2.1. Efecto del diluyente y el tiempo sobre la población 1, lentos progresivos. El gráfico corresponde al porcentaje de la población lento progresivo a t0 y t60, para las muestras en fresco y congelado en ambos diluyentes. Los círculos representan las muestras en fresco y los triángulos representan las muestras congeladas. El color rosa hace referencia al diluyente Botucurio (BT), mientras que el color celeste hace referencia al Spectrum red (MR). El * indica la diferencia significativa de la prueba de Tukey.

En la Sp2 para las muestras en congelado no se observaron interacciones entre las variables tiempo y diluyente; tampoco se vio afectada por las variables de manera individual. Por el contrario, se observaron diferencias significativas ($p < 0,01$) en la variable tiempo, para las muestras en fresco, siendo 4 veces menor en t60 en ambos diluyentes (Figura 2.2). No se observaron diferencias en la variable diluyente, ni en la interacción diluyente-tiempo para las muestras en fresco.

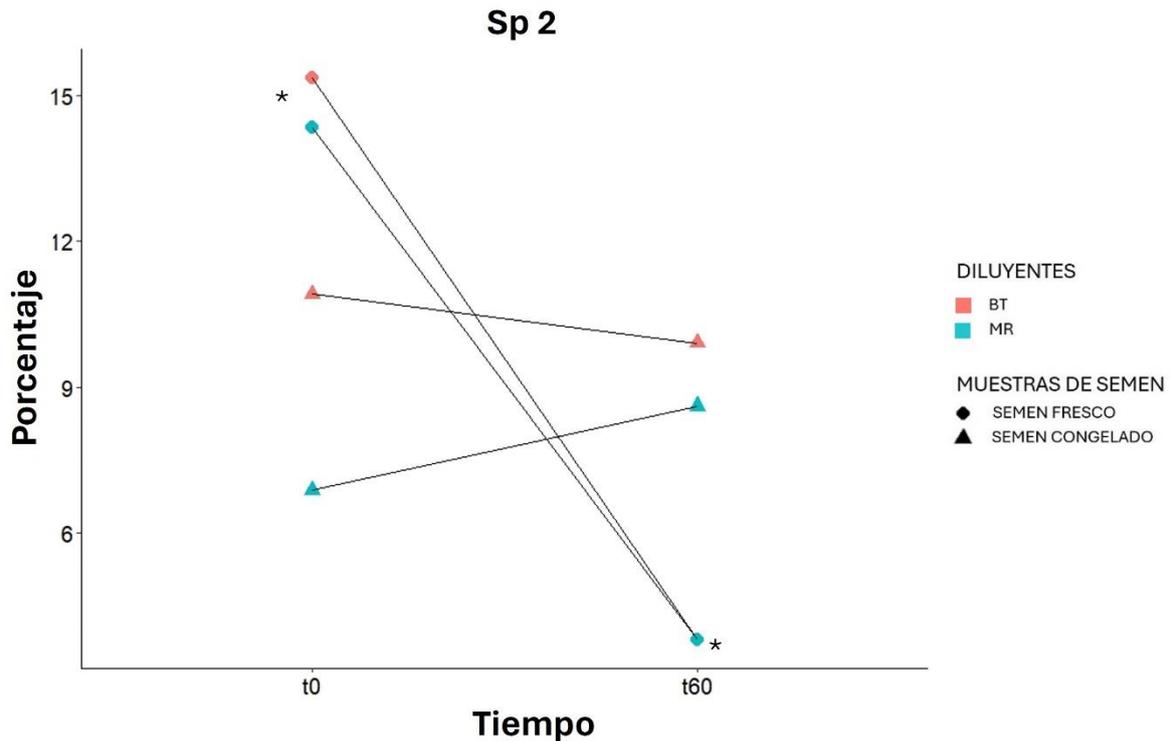


Figura. 2.2. Efecto del diluyente y el tiempo sobre la población 2, hiperactivos. El gráfico corresponde al porcentaje de la población hiperactivo a t0 y t60, para las muestras en fresco y congelado en ambos diluyentes. Los círculos representan las muestras en fresco y los triángulos representan las muestras congeladas. El color rosa hace referencia al diluyente Botucurio (BT), mientras que el color celeste hace referencia al Spectrum red (MR). El * indica las diferencias significativas con respecto a la variable tiempo.

Por último, en el caso del semen congelado, se observó una diferencia en la Sp3 para todas las variables de estudio y su interacción (Figura 2.3). Con respecto a la variable tiempo, disminuyó la proporción de rápidos progresivos en BT (46% vs 29%) y MR (30% vs 24%) para t0 y t60, respectivamente ($p < 0.001$) (Figura 2.3). También se observó diferencias entre los diluyentes ($p < 0.001$), BT presentó más proporción de espermatozoides rápidos progresivos que MR (46% vs 30%) en t0 y en menor medida en t60 (29% vs 24%) (Figura 2.3). Además, se observó una interacción significativa entre diluyente y tiempo ($p < 0,01$). La prueba de Tukey mostró que las diferencias se observaron en BT en t0, presentando un mayor porcentaje de Sp3 (46%) con respecto a BT en t60 (29%) y RM en ambos tiempos (30%, 29%) t0 y t60

respectivamente (Figura 2.3). Por último, la Sp3 no se vio afectada en las muestras de semen fresco.

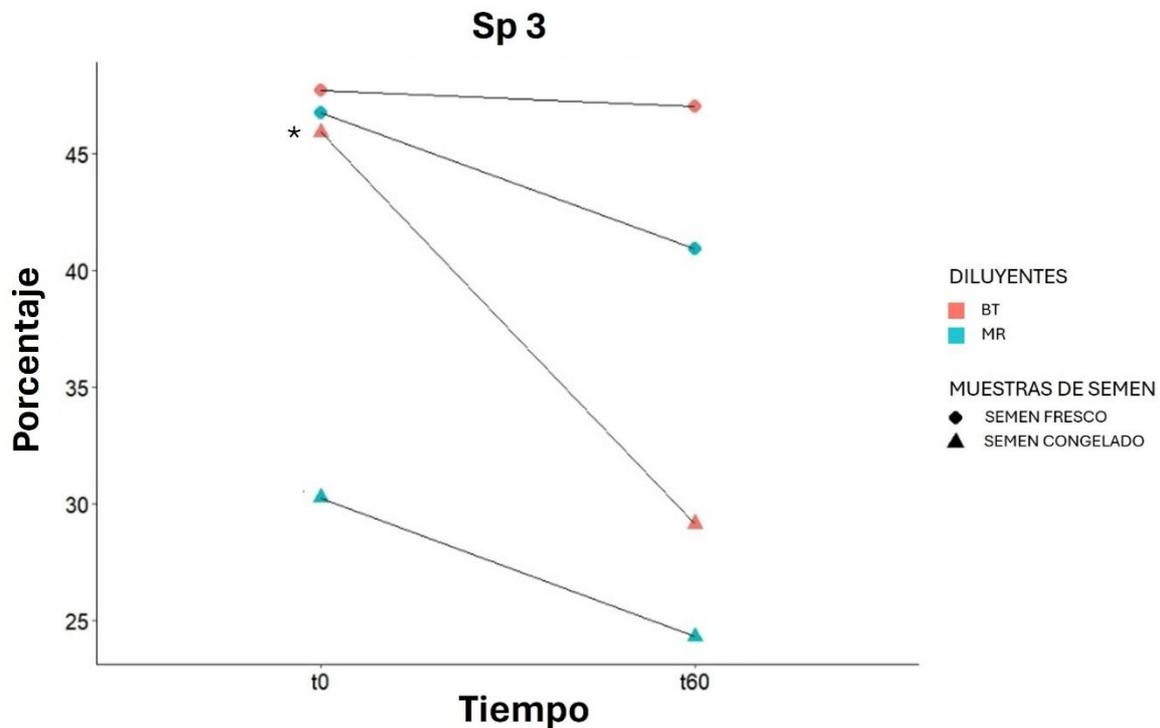


Figura. 2.3. Efecto del diluyente y el tiempo sobre la población 3, rápido progresivos. El gráfico corresponde al porcentaje de la población rápido progresivo a t0 y t60, para las muestras en fresco y congelado en ambos diluyentes. Los círculos representan las muestras en fresco y los triángulos representan las muestras congeladas. El color rosa hace referencia al diluyente Botucurio (BT), mientras que el color celeste hace referencia al Spectrum red (MR). El * indica la diferencia significativa de la prueba de Tukey.

Efecto del congelado en el diluyente BT (Botucurio)

En la figura 2.4 se observa el efecto de la congelación sobre los porcentajes de las tres subpoblaciones de estudio con el diluyente BT en t0 y t60, mediante la prueba Z. La subpoblación lenta progresiva (Sp1) fue significativamente mayor el porcentaje en las muestras congeladas tanto en t0 como t60 ($p < 0,05$). La subpoblación hiperactiva (Sp2) fue significativamente menor en el semen congelado en t0 respecto del fresco, pero fue significativamente mayor en el congelado t60 ($p < 0,05$). Finalmente, se observó una menor

diferencia significativa de Sp3 en muestras congeladas en comparación con las frescas, siendo más evidente en t60 ($p < 0,05$).

BOTUCRIO

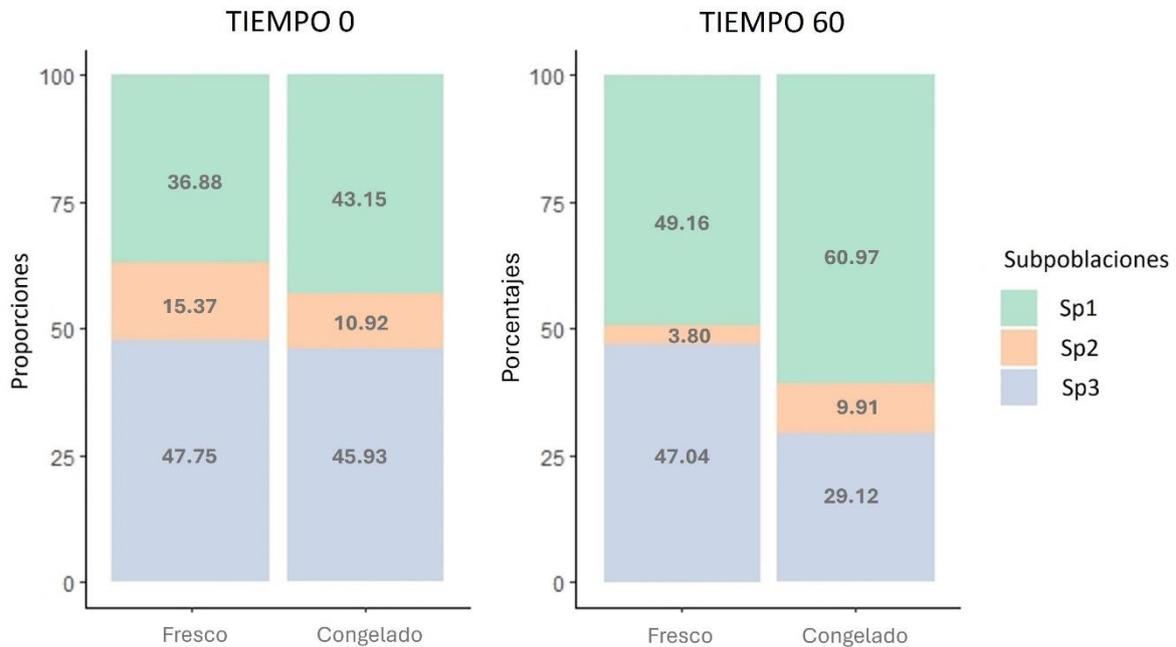


Figura 2.4. Efecto del congelado sobre el diluyente Botucrio sobre las subpoblaciones de estudio. El gráfico de la izquierda corresponde a las muestras a t0 y el de la derecha a las muestras a t60. En el eje X se puede ver las muestras frescas y congeladas y el eje Y los porcentajes de las subpoblaciones.

Efecto de la congelación en el diluyente MR (Spectrum Red)

En la figura 2.5 se observa el efecto de la congelación sobre las proporciones de las tres subpoblaciones de estudio con el diluyente MR en t0 y t60, mediante la prueba Z. En todas las subpoblaciones se observaron diferencias significativas entre fresco y descongelado en los distintos tiempos. La población lentamente progresiva (Sp1), fue significativamente mayor tras la descongelación en ambos tiempos, siendo más significativo en t0, con respecto a t60 ($p < 0,05$). En la subpoblación hiperactiva (Sp2) se observaron diferencias significativas en t0, disminuyendo significativamente la proporción en congelado respecto al fresco

($p < 0,05$), mientras que en t_{60} los hiperactivos aumentaron significativamente tras la descongelación. Los resultados obtenidos en esta subpoblación fueron similares a los obtenidos con el diluyente BT. Por último, la subpoblación rápida progresiva (Sp3), mostró diferencias significativas en ambos tiempos ($p < 0,05$), además las proporciones disminuyeron de manera significativa en las muestras congeladas en comparación con las muestras frescas ($p < 0,05$).

SPECTRUM RED

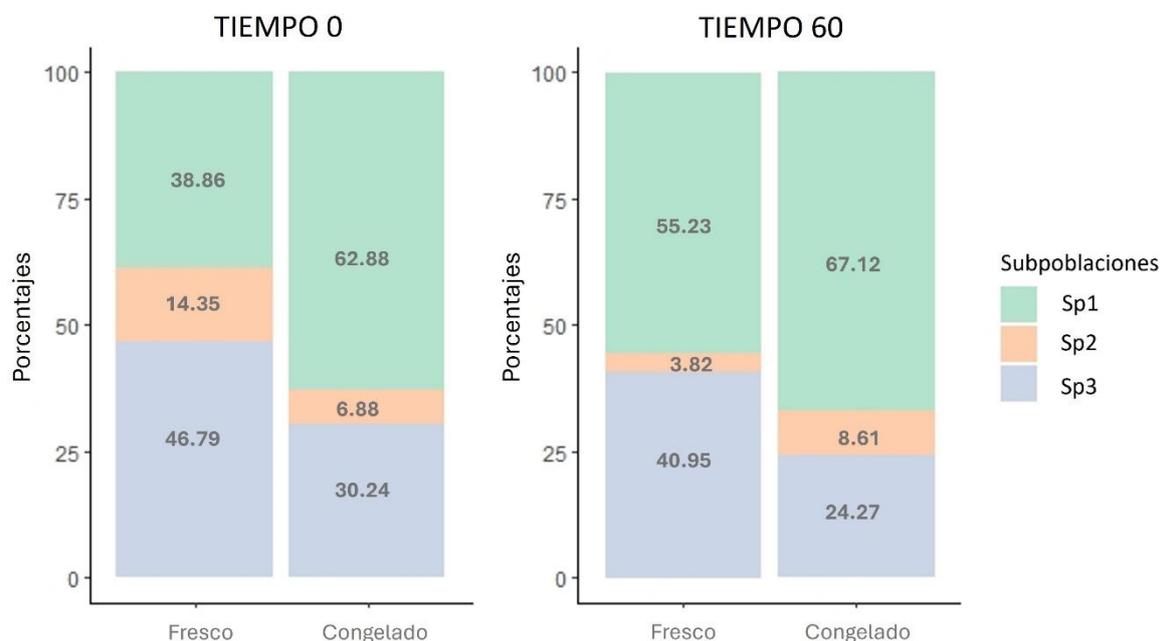


Figura 2.5. Efecto del congelado sobre el diluyente Spectrum Red sobre las subpoblaciones de estudio. El gráfico de la izquierda corresponde a las muestras a t_0 y el de la derecha a las muestras a t_{60} . En el eje X se puede ver las muestras en fresco y congelado y el eje Y los porcentajes de las subpoblaciones.

DISCUSIÓN

El estudio de espermatozoides agrupados en subpoblaciones permite determinar diferencias entre grupos a nivel poblacional (Teran y col., 2021). Nuestro estudio evidencia la existencia

de 3 subpoblaciones de espermatozoides específicas y bien definidas en eyaculados de sementales PRE: la subpoblación 1 (Sp1) comprende espermatozoides lentos progresivos, la subpoblación 2 (Sp2) consiste en espermatozoides hiperactivos y la subpoblación 3 (Sp3) está compuesta por espermatozoides rápidos progresivos, en función de sus características de motilidad. La aplicación del CASA y los análisis estadísticos correspondientes, han demostrado ser herramientas valiosas para identificar con precisión estas subpoblaciones en équidos y otras especies (Barbas y col., 2018).

Nuestros hallazgos, al igual que Quintero-Moreno y col. (2003) destacaron la importancia del estudio de subpoblaciones. El estudio específico de las subpoblaciones de espermatozoides que son rápidos progresivos, es crucial debido a su asociación con la fertilidad de la especie. Mejorar el estudio de esta subpoblación podría ser una poderosa herramienta para mejorar el análisis global de la calidad del semen en los eyaculados de sementales. Este enfoque podría aportar una nueva perspectiva al análisis clásico de la calidad del semen equino y facilitar la identificación y resolución de posibles problemas que podrían pasar desapercibidos con métodos convencionales.

Con respecto al análisis de la interacción entre diluyente-tiempo, en las muestras frescas no se observaron diferencias en la subpoblación Sp1, ni Sp3, lo cual era esperable dado que ambos diluyentes se utilizan para la criopreservación y no para inseminación. Sin embargo, en la subpoblación Sp2, solo se observaron diferencias con respecto al tiempo en las muestras en fresco. Esta población está conformada por espermatozoides hiperactivos, esta disminución del porcentaje se debe al alto nivel de actividad de estos espermatozoides, que conlleva un mayor gasto energético y el mismo disminuye conforme pasa el tiempo.

En cuanto a las muestras congeladas, tanto Sp1 como Sp3 se vieron afectadas por la interacción diluyente-tiempo. En ambas subpoblaciones, el diluyente BT mostró mejores resultados. En la subpoblación Sp1, se observaron menos proporciones de espermatozoides lentos progresivos con BT que con MR, mientras que en la Sp3, se observó mayor proporción de rápidos progresivos con BT que con MR. Sin embargo, al analizar la variable tiempo, se observó que las proporciones variaban independientemente del diluyente, lo que sugiere que no se puede afirmar que uno sea superior al otro, ya que en el caso de Sp1 aumentan los números de lentos y en la Sp3 disminuyen los rápidos cuando se pasa de t0 a t60. Esto es de esperarse ya que conforme el tiempo pasa, los espermatozoides rápidos tienden a ser más lentos.

Se sabe que la criopreservación del semen es uno de los métodos que facilita la distribución de diferentes líneas genéticas entre los animales. Sin embargo, existe una variabilidad considerable en la capacidad de los espermatozoides de diferentes sementales para resistir el proceso de congelación, e incluso existe variación en la fertilidad entre eyaculados de un mismo caballo. Los criadores de caballos prefieren utilizar semen fresco o refrigerado (5°C), dado que la capacidad de fertilización del semen equino después de la descongelación es inferior a la de otras especies (Nikitkina y col., 2020). Por lo tanto, es importante desarrollar diluyentes y combinaciones de diluyentes con protocolos adecuados de descongelación.

En nuestro estudio respecto al efecto de la congelación con los diluyentes Botucio (BT) y Spectrum red (MR) identificamos diferencias al analizar las distintas subpoblaciones. Nos centramos en la subpoblación rápido progresivo, ya que está asociada con la fertilidad. A partir de los análisis, sugerimos que el diluyente BT proporciona mejores resultados que el diluyente MR a t0, aunque estadísticamente no se puede afirmar que uno sea superior al

otro, ya que se observan diferencias en los porcentajes de espermatozoides rápidos progresivos en las muestras frescas y congeladas a t0, sin embargo se ve que esta diferencias es significativamente menor en BT comparado con MR. Clavijo Barrera (2015) encontró resultados similares al estudiar el diluyente BT en los parámetros de rutina de calidad seminal después de la criopreservación, lo que puede atribuirse a su composición química, que incluye azúcares, yema de huevo, hidratos de carbono, aminoácidos, conservantes, penicilina (1,0 g/L), gentamicina (0,5 g/L), excipientes, crioprotectores, glicerol (en baja concentración), amidas (dimetilformamida) y agua ultra pura. Debido a su bajo peso molecular, las amidas pueden penetrar a través de la membrana plasmática y acrosomal de los espermatozoides, lo que mantiene la integridad de la membrana y reduce el daño osmótico (Clavijo Barrera, 2015). Por otro lado Navarro (2022), estudió el efecto de varios diluyentes (entre los que se encontraban BT y MR) sobre los parámetros cinéticos en el Pura Raza Lusitano y no pudo determinar si un diluyente era mejor que el otro. Ellos no trabajaron con subpoblaciones, sino con individuos. Por lo cual, el efecto del proceso de criopreservación no es el mismo para todos los individuos, ni para todos los eyaculados de un mismo individuo. Lo que demuestra que no sólo existe variabilidad entre sementales, sino también, dentro de un mismo semental, entre diferentes muestras. Por lo tanto, trabajar con subpoblaciones puede ser más apropiado para evitar estas diferencias y permitir comparaciones más precisas. Además, utilizamos un protocolo estandarizado con eyaculados obtenidos en un periodo de tiempo específico y utilizados las mismas muestras para las comparaciones de fresco y congelado para minimizar las diferencias.

CONCLUSIONES SOBRE LA CALIDAD SEMINAL

En el capítulo I se analizó el efecto de la edad y la consanguinidad sobre características fenotípicas de la calidad seminal en caballos de pura raza española. Se comprobó que la edad no afectó a los parámetros cinéticos de calidad seminal en el grupo de sementales analizados. Sin embargo, se demostró que un alto coeficiente de consanguinidad redujo la velocidad media y el patrón de trayectoria de los espermatozoides en PRE. Estos resultados indicaron que los altos niveles de consanguinidad pueden comprometer gravemente la calidad espermática del semental PRE, lo que posteriormente, puede tener una influencia negativa en la fertilidad. Los estudios en curso que utilizan datos genómicos ayudarán a detectar variantes genéticas asociadas con la calidad del semen de los sementales y cómo se ve influida por la consanguinidad en regiones genómicas específicas.

Por último, en el capítulo II se estudió en las subpoblaciones cinemáticas de esperma, el impacto que tenía la congelación y el diluyente en el esperma de sementales. Nuestros resultados indican que el uso del CASA y el análisis de subpoblaciones es un buen método para estudiar la calidad del semen en caballos. Además, se ha demostrado que la congelación afecta a la calidad del semen y que el uso del diluyente Botucrío sería una buena opción cuando se desea criopreservar, ya que mantiene la calidad del semen. Sin embargo, no existe un diluyente que sea ideal para ser utilizado en todos los sementales, ni que brinde la misma efectividad para todas las muestras. Por este motivo es importante seguir estudiando y optimizando los diluyentes ya existentes, como así también los protocolos de congelado.

Este trabajo genera una aproximación muy interesante al estudio de subpoblaciones en especies equinas y la importancia de la congelación y la elección del diluyente para la criopreservación. En un trabajo futuro sería interesante continuar este trabajo realizando pruebas de fertilidad para aportar información adicional sobre la influencia de los diluyentes en la subpoblación rápidamente progresiva.

CAPÍTULO III: DETECCIÓN Y ANÁLISIS DE ALTERACIONES DEL NÚMERO DE COPIAS CROMOSÓMICAS EN EL CABALLO DOMÉSTICO MEDIANTE DATOS DE GENOTIPADO DE MATRICES SNP

INTRODUCCIÓN

El uso de SNP-arrays se está convirtiendo en una parte clave de los programas de cría de animales domésticos (Pryce y Daetwyler, 2012; Wiggans y col., 2017). En la actualidad, el número de animales genotipados está aumentando exponencialmente, incluso en equinos, donde el desarrollo de programas genómicos es cada vez más común en todo el mundo (McCoy y col., 2019; McGivney y col., 2020). Por lo tanto, se espera que el número de caballos genotipados también aumente considerablemente en los próximos años.

La detección de alteraciones del número de copias (CNA) utilizando datos de SNP-array es una técnica comúnmente utilizada en el asesoramiento genético humano (Harton y col., 2013). Sin embargo, rara vez se ha empleado en animales domésticos y menos aún como metodología de cribado (Raudsepp y Chowdhary, 2016). Hasta la fecha, solo se ha realizado una detección sistemática a gran escala en el vacuno, en el que se analizaron más de 100 000 individuos, detectando una prevalencia muy baja (Berry y col., 2017). En caballos, solo se han realizado hasta la fecha dos estudios, los cuales incluyen dos potros (Holl y col., 2013) en uno de los casos y 55 fetos (Shilton y col., 2020) en el otro.

La incidencia de aberraciones relacionadas a los cromosomas sexuales en el caballo doméstico es elevada (en torno al 2% en algunas poblaciones según Bugno, Słota, y Kościelny (2007)) en comparación con otras especies domésticas (Villagómez y Pinton, 2008). Entre ellas, la monosomía del cromosoma X 63,X (Gamo y col., 2018), como en mosaicismo 64,XX/63,X (Kjöllerström y col., 2011) y las hembras con sexo reverso (64,XYDSD), son las aberraciones más comunes (Villagómez y col., 2011). Estos síndromes son difíciles de detectar a una edad temprana, ya que las anomalías fenotípicas aparecen después de la pubertad (Anaya y col., 2014). Por el contrario, machos con sexo genético reverso (64,XXDSD) e individuos que portan el quimerismo verdadero del par sexual (64,XX/64, XY) también se detectaron en caballos, pero en menor medida (Power y Leadon, 1990). Todas estas anomalías excepto el quimerismo, suelen estar asociadas a alteraciones morfológicas, como ser genitales ambiguos: una vulva fusionada, hipoplasia ovárica o un clítoris agrandado (Albarella y col., 2018; Bannasch y col., 2007; Lear y McGee, 2012), lo que simplifica su detección. La excepción a estos fenotipos anormales es el quimerismo hematopoyético, que se da en caso de que un feto hembra y un feto macho compartan el útero durante la gestación, habiendo una mezcla de células de ambos a nivel medular y sanguíneo. A diferencia del síndrome “*freemartin*” del bovino, este tipo de presentaciones en caballos suelen ser fenotípicamente normales (Anaya y col., 2018).

Las alteraciones del número de copias (CNA) en caballos se han diagnosticado utilizando diferentes enfoques, incluyendo el cariotipo (Neuhauser y col., 2019), la hibridación fluorescente *in situ* (Bugno, Słota, Pieńkowska-Schelling, y col., 2007), el recuento de alelos de “*short tandem repeats* (STR)” utilizando paneles estándar (Demyda-Peyras y col., 2014) o específicos (Anaya y col., 2017) y, más recientemente, la PCR digital (Szczerbal y col., 2020).

Estas técnicas son de elevado costo y/o altamente específicas para un síndrome concreto, lo que hace problemática su integración en su detección rutinaria, como método de cribado. Esto es aún más difícil en individuos portadores de mosaicismos cromosómicos, en los que la detección no es posible mediante estos métodos basados en el ADN.

En los mamíferos, existe una región específica que muestra una homología de secuencia (98-100%) entre ambos cromosomas sexuales, denominada región pseudoautosómica (PAR) (Raudsepp y col., 2012). Esta región se encuentra en la parte proximal del brazo p del ECAX en el caballo e incluye 1,8 Mb y 18 genes (Raudsepp y Chowdhary, 2008). Dado que la PAR es la única región con marcadores comunes en ECAY y ECAX, nuestra hipótesis es que analizar su heterocigosidad podría ser una opción interesante para detectar cierto tipo de anomalías en cromosomas del par sexual.

En la actualidad, sólo se dispone de tres *arrays* de genotipado SNP en caballos: uno de ellos de alta densidad, el *Axiom™ Equine Genotyping Array* (Thermofisher), que incluye 670.796 marcadores SNP y dos de ellos de mediana densidad: el *Equine GGP V5* (Neogen, UK), que incluye 71.000 marcadores y el *Equine GGP Plus*(VIT, Germany) que incluye cerca de 80.000 marcadores (Schaefer y McCue, 2020). Todos estos *arrays* son muy fiables, pero en algunos casos pueden ser problemáticos cuando se intenta generar un conjunto de datos de consenso, no sólo porque incluyen diferentes marcadores SNP, sino también porque los resultados se presentan en formatos diferentes. A pesar de ello, ambas plataformas determinan las variantes alélicas en cada locus e individuo comparando dos parámetros [log R ratio (LRR) y frecuencia alélica B (BAF)] obtenidos a partir de la intensidad de hibridación de un conjunto de sondas específicas de locus (dos sondas, una por alelo). De la siguiente manera:

$$\text{LRR} = \log_2 \left(\frac{(iA + iB)}{(irA + irB)} \right) \quad \text{BAF} = \log_2 \left(\frac{(iB)}{(irA + irB)} \right),$$

donde **iA** e **iB** son las intensidades de hibridación detectadas en alelos A y B, respectivamente, en cada muestra y **irA** e **irB** son la mediana de la intensidad total para los alelos A y B en un conjunto de muestras de referencia seleccionadas (normales y diploides) (ThermoFisher, 2019). En cada locus concreto, LRR indica la presencia de pérdidas o ganancias de CN y BAF es una medida de la heterocigosidad. Por lo tanto, cualquier detección de CNA basada en el análisis de BAF y LRR podría implementarse fácilmente independientemente de la plataforma de genotipado empleada.

A partir de lo expuesto anteriormente, presentamos aquí una técnica sencilla, robusta y semiautomatizada para la detección de anomalías cromosómicas en caballos basada en el análisis de los datos de las dos plataformas de genotipado SNP más comunes.

METODOLOGÍA

Animales

Se analizaron 19 individuos pertenecientes a la raza Pura Raza Española, que habían sido diagnosticados previamente con diferentes anomalías cromosómicas en el Laboratorio Citogenético y Molecular de la Universidad de Córdoba, así como 14 individuos que presentaban anomalías fenotípicas en el aparato reproductor (genitales ambiguos u ovarios y/o úteros hipoplásicos) o comportamiento sexual anormal (yeguas que intentaban montar a otras yeguas). En la Tabla S3.1 se ofrece una breve descripción de los individuos, así como

del origen de la muestra. Además, analizamos 22 sementales PRE y 209 yeguas PRE con fertilidad probada como controles. La selección de estos individuos se basó en dos premisas: en primer lugar, que presentaran morfología y función reproductiva normales en el examen completo de aptitud para la reproducción realizado por la Asociación Nacional de Criadores de Caballos de Pura Raza Española (ANCCE) antes de ser aceptados como reproductores y, en segundo lugar, que todos estos animales hubieran producido al menos una descendencia normal en el momento del estudio.

Cariotipado y análisis molecular

Los complementos cromosómicos se determinaron en 19 individuos mediante cariotipado simple y tinción con Giemsa (n = 7, cariotipo completo), hibridación in situ con fluorescencia de cromosomas completos (n=12) y ambas técnicas (n = 6). En todos los casos, al menos 100 metafases celulares obtenidas de cultivos de linfocitos se evaluaron siguiendo nuestros protocolos (Bugno, Słota, y Kościelny, 2007; Demyda-Peyras, Membrillo, y col., 2013). Además, se recuperó ADN de muestras de sangre de 14 casos adicionales y 231 controles (22 sementales y 209 yeguas, obtenidas directamente de la ANCCE) utilizando el kit de extracción de ADN en sangre Canvax (Canvax Biotech, España). Por último, se determinaron los complementos cromosómicos del par sexual en todas las muestras (n = 264) mediante la metodología basada en STR previamente validada para la raza PRE (Anaya y col., 2017).

Genotipado mediante SNP-array

Todos los individuos (n = 264) fueron genotipados utilizando el SNP HD *Axiom™ Equine Genotyping Array* (Thermofisher), compuesto por ~670 000 SNPs (Schaefer y col., 2017). Los archivos sin procesar (.CEL) se procesaron utilizando el software *Axiom Analysis Suite 5.0*

(ThermoFisher) siguiendo el flujo de trabajo de mejores prácticas de genotipado ("*best genotyping practices*") de la plataforma utilizando los parámetros predeterminados [control de calidad de placa (DQC) $\geq 0,82$ y *call rate* por individuo $\geq 97\%$]. Solo se utilizaron marcadores SNP que mostraron una alta calidad de discriminación alélica [*SNP call rate* $> 95\%$ y discriminante lineal de Fisher $>3,6$; de acuerdo a los procedimientos estándar de la plataforma (ThermoFisher, 2013)]. El conjunto de datos final (alta densidad; HD) incluía 17.965 SNP localizados en el ECA10 (utilizados como control autosómico), 24.854 en el ECAX y 1 en el ECAY. Los marcadores cromosómicos ECAX se agruparon en dos regiones para su análisis: la región PAR incluía 675 SNP situados entre las posiciones 1 y 1,86 Mb de ECX (Raudsepp y Chowdhary, 2008), y la no PAR ECAX entre 1.861-128.21 Mb, incluía 24.179 SNPs. Finalmente, los valores de LRR y BAF fue obtenidos por individuo y marcador siguiendo el flujo de trabajo estándar del software AXIOM CNV (ThermoFisher, 2013), utilizando el EquCab 3.0 como el genoma de referencia (Beeson y col., 2019).

En un experimento adicional, con el objetivo de comprobar si la densidad de SNP's del *array* empleado podía afectar a los resultados, repetimos todos los análisis utilizando dos *datasets* de mediana (MD) y baja (LD) densidad creados mediante análisis bioinformático. El *dataset* MD se creó incluyendo únicamente los SNP disponibles en las tres matrices de caballos (Axiom™ 670K, GGPV5 y GGP Plus), mientras que LD se estableció seleccionando aleatoriamente 10.000 SNP del conjunto de datos MD. Tras un filtrado y procesamiento adicionales, el *dataset* MD incluyó valores de LRR y BAF de 4956 marcadores (2107 en ECA10, 26 en PAR y 2823 en no PAR), mientras que el *dataset* LD incluyó 844 marcadores totales (358 en ECA10, 7 en PAR y 479 en no PAR) por cada individuo. Por último, se determinó el valor de consanguinidad individual de cada animal, ya que parte de las

determinaciones se basan en el análisis de BAF, el cual es afectado por el nivel de endogamia de los individuos. Este hecho podría ser particularmente importante en los caballos PRE, donde pueden alcanzar el 50% (Perdomo-Gonzalez y col., 2020). Para ellos, primero determinamos el valor de consanguinidad endogamia molecular del ECAX (F_{ROHX}) en las yeguas control utilizando el paquete DETECTRUNS (Biscarini y col., 2018). La longitud mínima de ejecución de homocigosis se fijó en 1 Mb, y los SNP *missing* y heterocigotas permitidos se establecieron por cromosoma basándose en nuestra metodología (Goszczyński y col., 2018). Finalmente, los individuos se agruparon en dos grupos según su valor de F_{ROHX} de la siguiente manera: yeguas consanguíneas ($F_{ROHX} > 0,50$; $n = 16$, HOM-MARES) y yeguas no consanguíneas ($F_{ROHX} < 0,5$, $n = 193$, MARES).

Análisis de CNA

La detección de alteraciones en el número de copias se realizó mediante el análisis conjunto de LRR y BAF. Para ello, en primer lugar, determinamos el porcentaje de heterocigosidad (HET) de cada individuo, como la relación entre los marcadores heterocigotas (aquellas con BAF entre 0,25 y 0,75, según Popova y col. (2009)) y el total de marcadores, en cada individuo y región cromosómica (ECA10, PAR y no-PAR). A continuación, la presencia de CNA se realizó comparando los patrones LRR y HET (bajo, alto o intermedio) en cada región entre los grupos de control (yeguas normales, yeguas consanguíneas y machos) y los individuos con diferentes tipos de CNA previamente determinados. La explicación detallada del enfoque metodológico se incluye en la sección resultados.

Análisis estadístico

Las diferencias LRR y BAF de cada tipo de CNA y los controles (consanguíneos y no consanguíneos) se determinaron mediante un modelo lineal generalizado y una prueba post-hoc de Bonferroni ($P < 0,05$). El modelo incluyó el grupo (7 niveles: 2 controles no consanguíneos, 1 control consanguíneo y 4 tipos de CNA) como factor fijo. Además, se determinó el efecto de la densidad del *array* utilizando un modelo lineal generalizado, incluyendo el grupo (los mismos 7 niveles) y el tipo de *array* (3 niveles) como factores fijos y utilizando un conjunto de datos fusionados que incluía los datos LD, MD y HD. Por último, el coeficiente de similitud (RV: RobertyEscoufier (1976)) entre cada par de parámetros de matriz (HET, LRR y BAF) se determinó utilizando un enfoque de remuestreo de Monte Carlo para estimar los valores p.

Todos los análisis se realizaron en el entorno estadístico R V4.0 (Team, 2020), utilizando los paquetes DATA.TABLE (Dowle y Srinivasan, 2019), DPLYR (Hadley y col., 2020) y MATRIXCORRELATIONS (Indahl y col., 2018). Las figuras se generaron utilizando KARYOPLOTTER (Gel & Serra 2017) y GGLOT2 (Wickham, 2016).

RESULTADOS

Análisis molecular y Cariotipado

Los resultados del cariotipo ($n = 13$) y/o de la hibridación *in situ* ($n = 12$) revelaron la existencia de dos individuos portando monosomía del ECAX (63,X), nueve hembras sexo reverso (64,XYDSD), cuatro machos sexo reverso (64,XXDSD) y cuatro animales presentando quimerismo hematopoyético (64,XX/64,XY) (Tabla S3.1). Sólo los animales quiméricos

presentaban un cariotipo complejo, con porcentajes de células 64,XY/64,XX que oscilaban entre el 42/58% y el 73/27%. No se detectó mosaicismo, ni quimerismo en los demás individuos analizados. El análisis de los resultados de genotipado mediante STR coincidió con los resultados citogenéticos en todos los individuos analizados (n = 19; Tabla S3.1). Además, los 14 individuos seleccionados por las anomalías fenotípicas se diagnosticaron como yeguas con sexo reverso (64. XYDSD; n = 9), y machos con sexo reverso (64XX DSD, n = 5). Por último, las yeguas (n = 209) y sementales (n = 22) utilizados como control se diagnosticaron como normales, con complementos cromosómicos sexuales según su sexo fenotípico.

Detección de CNA basada en SNP

El análisis de CNA utilizando el conjunto de datos HD se muestran en la Tabla 3.1. En ECA10, no se detectó ningún CNA, ya que los valores de LRR y HET en los grupos de control y con anomalías cromosómicas sexuales confirmadas (X0, XXDSD, XYDSD y XX/XY) fueron similares ($P > 0,05$) en todos los casos a los animales utilizados como control. Por el contrario, en los cromosomas sexuales, los animales afectados y no afectados mostraron combinaciones diferenciales de HET y LRR en todos los casos. Las yeguas normales (tanto consanguíneas, como no consanguíneas) mostraban un HET elevada y una LRR cercana a 0 ($P < 0,05$) tanto en la región PAR, como en la no-PAR. En contraste, en los machos el patrón fue similar solo en la región PAR (ya que los marcadores situados en esa región tienen un alelo complementario en ECAY) y un patrón compatible como hemicigosis (HET cercano a 0 y LRR cercano a -0,5) en la región no-PAR.

Entre los animales afectados, las yeguas con monosomía ECAX (63,X) mostraron un patrón hemicigoto en ambas regiones de ECAX, debido a la falta de una región complementaria en la PAR por la presencia de un único cromosoma sexual. Por último, los individuos con sexo

reverso (yeguas 64, XY DSD y caballos 64,XX DSD) mostraron resultados opuestos entre su sexo cromosómico y fenotípico. En todos los casos (n = 27), el análisis de CNA mostró los mismos resultados que los detectados por cariotipado o genotipado STR. Estos resultados también pudieron detectarse fácilmente mediante la observación directa de la representación gráfica del de HET y LLR por marcador en cada uno de los grupos (Figura 3.1).

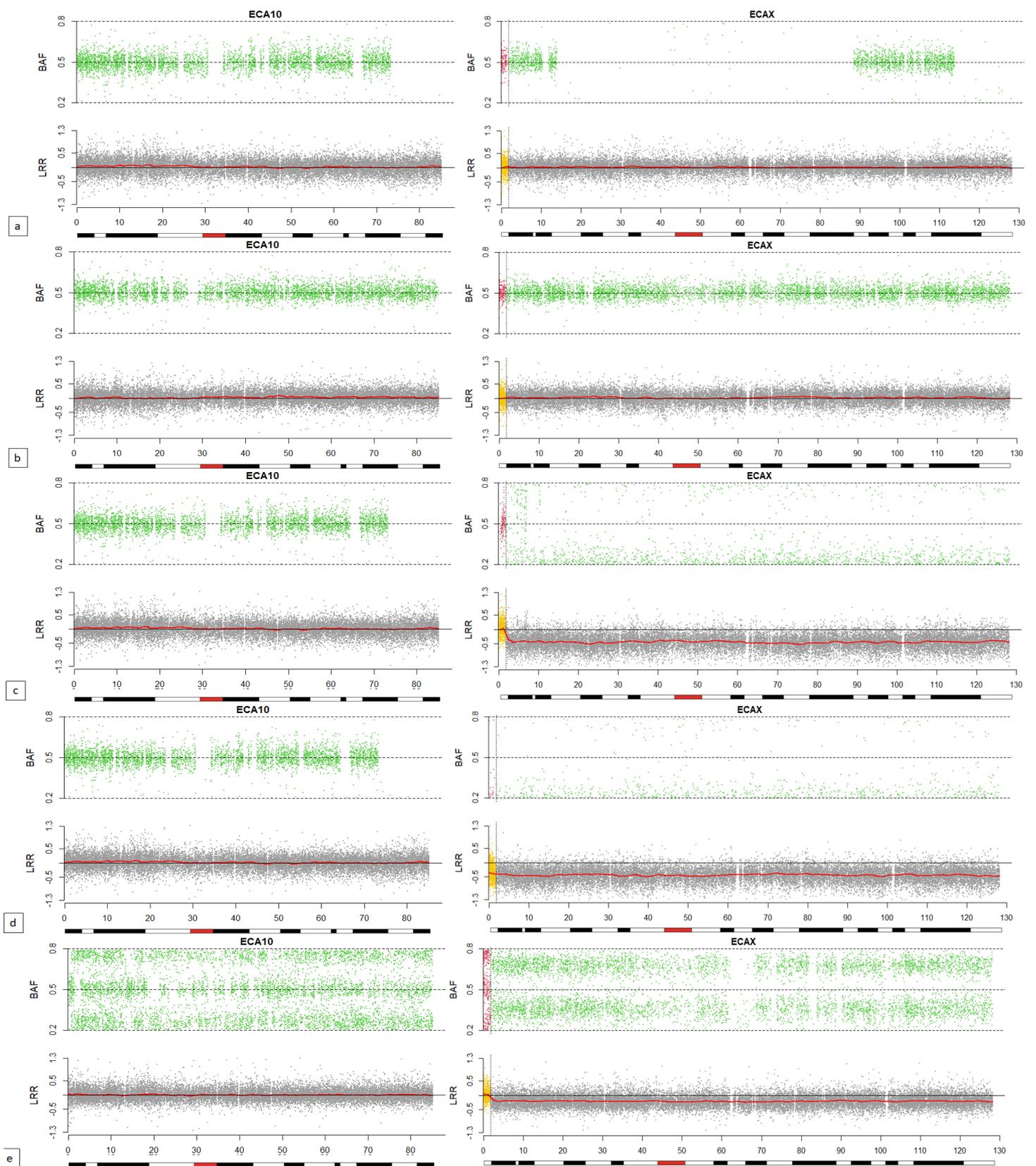


Figura 3.1. Valores de frecuencia alélica B (BAF; verde) y log R ratio (LRR; gris) de yeguas HOM (a), yeguas (b), machos (c), grupos 63,X (d) y 64,XX/64,XY (e). En cada figura, ECA10 se representa a la izquierda y ECAX a la derecha. En ECAX, los valores BAF y LRR de la región pseudoautosómica (PAR) se representan en rojo y amarillo, respectivamente. Los valores del eje X se expresan en Mb. Las yeguas HOM (a), yeguas (b) y 64,XXDSD (e) mostraron un patrón similar compatible con hembras en PAR y no PAR, mientras que los machos (c) y 64,XYDSD (e) mostraron un patrón similar compatible con machos. Por el contrario, las yeguas 63,X (d) mostraron un patrón diferencial en PAR ECAX (bajo LRR), permitiendo una clara diferenciación de los otros grupos.

Análisis de las medias de log R ratio (LRR) y heterocigosidad (HET) en siete grupos de caballos PRE con diferentes sexo-cariotipos utilizando un conjunto de datos SNP de alta densidad

GRUPO	N	ECA 10			NO PAR ECAX			PAR ECAX			ECA Y
		HET	LRR	BAF	HET	LRR	BAF	HET	LRR	BAF	
HOM-Mare	16	19.99±5.42	0.01±0.27	0.44±0.43	9±2.74 ^b	0.01±0.26 ^a	0.44±0.46	20.62±8.85 ^A	-0.01±0.32 ^A	0.49±0.43	NO
Mare	193	22.78±3.82	0.00±0.26	0.44±0.42	20.35±3.2 ^a	0.00±0.24 ^a	0.44±0.43	24.57±6.55 ^A	-0.01±0.28 ^A	0.5±0.42	NO
Male	22	23.88±3.61	0.01±0.27	0.44±0.41	1.67±0.92 ^c	-0.42±0.28 ^c	0.46±0.43	27.19±4.14 ^A	0.00±0.30 ^A	0.5±0.41	SI
XO	2	25.37±1.75	0.02±0.33	0.44±0.41	1.05±0.65 ^c	-0.42±0.3 ^c	0.46±0.44	0.44±0.21 ^B	-0.32±0.35 ^B	0.52±0.46	NO
XXDSD	4	23.53±2.36	0.00±0.27	0.44±0.42	21.77±2.52 ^a	-0.01±0.26 ^c	0.44±0.42	29.73±1.56 ^A	0.01±0.29 ^A	0.5±0.4	NO
XYDSD	18	25.09±2.25	0.01±0.29	0.44±0.41	2.25±2.2 ^c	-0.46±0.3 ^a	0.47±0.43	26.49±5.5 ^A	0.04±0.31 ^A	0.49±0.41	SI
XX/XY	4	22.09±3.5	0.00±0.23	0.44±0.4	15.18±6.18 ^a	-0.22±0.23 ^b	0.45±0.42	23.3±3.35 ^A	0.00±0.26 ^A	0.5±0.39	SI

Tabla 3.1 Análisis de las medias de log R ratio (LRR) y heterocigosidad (HET) en siete grupos de caballos PRE con diferentes sexo-cariotipos utilizando un conjunto de datos SNP de HD. Los valores se expresan como SD media. Dentro de las columnas, diferentes superíndices muestran diferencias estadísticas a $P < 0,05$ (minúsculas) y $P < 0,01$ (mayúsculas).

Los resultados para los individuos quiméricos (64,XX/64,XY) también se muestran en la Tabla 3.1. En ECA10 y PAR no hubo diferencias en las medias de HET, LRR y BAF, ya que el quimerismo estaba equilibrado. En este caso, el genotipo de cada marcador está formado por una combinación de dos genotipos posibles de las líneas paterna (AA) y materna (BB). Sin embargo, las combinaciones homocigóticas (AAAA; BAF >0,75 y BBBB, BAF < 0,25) se descartaron durante la estimación del HET. Por lo tanto, el quimerismo puede detectarse mediante el análisis de la dispersión BAF, que muestra una curva con tres picos asociados a los genotipos AAAB, AABB y ABBB (Figura 3.2a). Por el contrario, en no-PAR, BAF mostró una curva con sólo dos picos (Figura 3.2b) asociados a los genotipos AAB o ABB, ya que la línea materna tiene dos alelos posibles (A o B) mientras que la línea paterna es hemicigótica, y por lo tanto sólo tiene un único alelo posible (A). Por esta razón, un pico AABB (localizado cerca de 0.5 en PAR y ECA10) no puede estar presente en individuos mosaicos, lo que nos permite discriminar entre individuos portadores de CNAs balanceados (quiméricos) y no balanceados (mosaicos). Por otro lado, los individuos quiméricos macho/hembra se caracterizaron por un valor intermedio de LRR (cercano a -0,22) sólo en no-PAR ($P < 0,05$; Tabla 3.1), en comparación con los individuos portadores de una (LRR cercana a -0,5) o dos copias de no-PAR (LRR cercana a 0). Este patrón se produce porque el LRR es una estimación indirecta del contenido de ADN de la muestra, y por tanto, los valores intermedios también indican la presencia de mosaicismo/quimerismo en el que una de las líneas celulares es aneuploide.

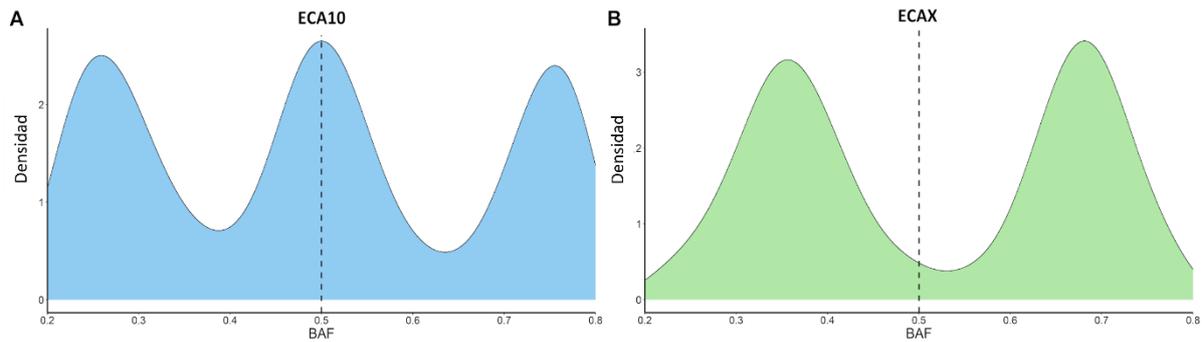


Figura 3.2 Diagrama de densidad de los valores de frecuencia de alelos B en el grupo 64,XX/64,XY. ECA10 (a) muestra un pico trimodal. ECAX (b) muestra un pico bimodal producido por el desequilibrio cromosómico entre líneas celulares del mismo individuo.

Además, nuestros resultados mostraron que, HET en las yeguas no consanguíneas era menor comparado con las yeguas normales ($p < 0,05$), pero era mayor en comparación con los individuos portadores de una sola copia ECAX (machos, 64,XY DSD y 63,X), lo que demuestra que este método también es válido para analizar individuos altamente consanguíneos.

Por último, todos los resultados obtenidos utilizando datos HD se replicaron utilizando los conjuntos de datos reducidos MD y LD (Tablas S3.2 y S3.3, respectivamente). No se encontró ninguna interacción en el análisis estadístico entre el grupo y el tipo de *array* (valores P de 0,35, 0,99 y 0,96 para HET, LRR y BAF, respectivamente). Además, los coeficientes RV entre los pares de conjuntos de datos de cada parámetro fueron de 0,861 (HD-LD), 0,901 (MD-LD) y 0,958 (HD-MD), mostrando una gran consistencia (con un valor p de $<0,0001$ en todos los casos), independientemente de la densidad del *array*.

DISCUSIÓN

En este estudio, hemos propuesto una metodología sencilla y robusta basada en datos de SNP-array para detectar individuos portadores de cuatro de los tipos más comunes de CNA en caballos. A pesar de que una metodología similar se emplea de forma rutinaria en el diagnóstico genético preimplantacional de aneuploidías en humanos, su uso en animales

domésticos sigue siendo infrecuente. Nuestra técnica permitió detectar cuatro de las alteraciones cromosómicas sexuales más frecuentes en caballos (Power, 1990; Villagómez y col., 2011) en 33 individuos. Además, los resultados obtenidos en quimeras macho-hembra demuestran que el análisis SNP-CNA también puede detectar individuos portadores de mosaicismos ECAX. Este es un punto importante teniendo en cuenta que 63,X/64,XX, la tercera alteración cromosómica del par sexual en importancia en esta especie (Bugno y col., 2001), no puede detectarse con los métodos moleculares actualmente disponibles (Anaya y col., 2017; Szczerbal y col., 2020). Sin embargo, todas las muestras analizadas en este estudio mostraron porcentajes similares de cada línea celular (64,XX o 64,XY en este caso). Esto se demostró por la amplia brecha observada entre los picos modales de BAF y por el valor intermedio de LRR observado en PAR de individuos XX/XY, que se han asociado previamente con el grado de quimerismo/mosaico en muestras humanas (Markello y col., 2012). Por el contrario, existen informes en caballos en los que el grado de quimerismo o mosaicismo detectado es bajo (Albarella y col., 2018). Dado que la precisión en detectar estos cariotipos complejos en humanos mediante CNA está determinada por la existencia de un grado mínimo de quimerismo (Goodrich y col., 2017), se necesitan más estudios para determinar el umbral mínimo de detección de esta técnica en caballos.

Nuestros resultados también mostraron una sólida detección y discriminación de los individuos 63,X y 64,XY DSD basada en el análisis de las regiones PAR y no-PAR. Ambos casos revelaron un patrón hemigigoto en la no-PAR, que también se observó en el PAR de los sujetos Turner (63,X). En comparación, 64, XYDSD presentó un PAR heterocigoto, en concordancia con un macho normal, mientras que la falta de compatibilidad entre el sexo

genético y el fenotípico permite su detección. Cabe destacar que estos patrones genómicos pueden ser detectados desde el nacimiento, e incluso mediante análisis de diagnóstico genético preimplantacional de biopsias embrionarias, permitiendo así a los criadores implementar el manejo precoz y adecuado de los individuos afectados.

Un punto para destacar en nuestro estudio es que la detección de CNA fue posible a pesar de la densidad de marcadores del *array* empleado (baja, media o alta). Esto quedó demostrado por el coeficiente RV obtenido entre cada par de *arrays* (cercano a 0,9 de media, $p < 0,0001$). Sin embargo, el hecho de que los resultados de LD fueran fiables sugiere que la detección de CNA puede integrarse en programas de mejora genómica basados en *arrays* personalizados de baja densidad (Bolormaa y col., 2015; Lopez y col., 2018), especialmente cuando las pequeñas diferencias observadas utilizando el conjunto de datos de LD en el PAR pueden superarse fácilmente aumentando el número de marcadores incluidos. Además, todo nuestro desarrollo y análisis se llevó a cabo en el entorno R, una plataforma bioinformática abierta, flexible y colaborativa. Así mismo, se analizaron los datos brutos (LRR y BAF), que se obtienen de cualquier plataforma de genotipado basada en hibridación. Ambos hechos hacen que esta metodología sea flexible y fácil de replicar, independientemente del *array* de genotipado empleado.

Otra ventaja de la detección de CNA basada en SNP es la flexibilidad para examinar todo el genoma con un único análisis (Tang y Amon, 2013). Por ejemplo, detectamos fácilmente el quimerismo existente en el ECA10 en individuos XY/XX. También es teóricamente posible detectar CNAs en cualquier otro cromosoma utilizando el mismo enfoque bioinformático propuesto en este estudio, pero variando los datos analizados. Esto fue sugerido recientemente por Shilton y col. (2020), que detectaron varios CNAs autosómicos en fetos

abortados utilizando un enfoque combinado que incluye datos de secuenciación directa (NGS) y SNP-arrays. Sin embargo, es importante tener en cuenta la selección del tejido utilizado para obtener el ADN antes del análisis, ya que las muestras no sanguíneas no permitirán determinar la presencia de quimerismo hematopoyético. Siendo que, las metodologías moleculares actualmente disponibles para la detección de CNA en caballos (por ejemplo, hibridación fluorescente in situ, PCR, PCR digital en gotas o análisis de STR) son extremadamente inflexibles, ya que todas ellas se basan en sondas o marcadores cromosómicos específicos y, por lo tanto, deben adaptarse a cada caso de forma empírica. Por consiguiente, la detección de CNA basada en SNP podría ser una herramienta interesante para aumentar nuestros conocimientos actuales sobre las aberraciones autosómicas en los caballos.

Un hallazgo inesperado fue la existencia de un pequeño porcentaje de heterocigosis (HET > 0) en las regiones no-PAR portadores de una sola copia de ECAX (X0, 64,XY DSDS y machos). En ellos, la HET fue de casi el 2% de media, lo que es 20 veces superior a la registrada en humanos utilizando la misma tecnología (0,1%, según Saunders et al. 2007). Estas falsas determinaciones se atribuyeron con anterioridad a diversas causas, pero sobre todo a la calidad de las muestras (Gunnarsson y col., 2008; Singh y col., 2016). Sin embargo, nuestras muestras se recogieron y procesaron en condiciones ideales, y los valores de CC, (control de calidad) del proceso de genotipado fueron óptimos. Por lo tanto, nuestra mejor hipótesis es que esos resultados heterocigotas “imposibles” en regiones no-PAR en individuos hemicigotas podrían producirse por los errores de mapeo de la versión actual del genoma equino, los cuales puede que sean reasignados a diferentes cromosomas (hasta un 5% según (Beeson y col., 2019) en futuras versiones del genoma de referencia equino en 2018

(Kalbfleisch y col., 2018). Esto es también sugerido por el hecho que los SNP-arrays disponibles en caballos se desarrollaron utilizando la versión anterior del genoma de referencia publicado en 2007 (Schaefer y McCue, 2020). En cualquier caso, dichos resultados anómalos no alteraron la robustez de la metodología empleada en el presente estudio.

Individual	Sample Origin	Phenotype	Reproductive Phenotype	Karyotype	FISH	STR
1	Cytogenetic Lab	Mare	Gonadal dysgenesis	63,X	63,X	X
2	Cytogenetic Lab	Mare	Gonadal dysgenesis	63,X	63,X	X
3	Cytogenetic Lab	Horse	Ambiguos genitalia		64,XX	XX
4	Cytogenetic Lab	Horse	N.D.		64,XX	XX
5	DNA	Horse	N.D.			XX
6	DNA	Horse	N.D.			XX
7	DNA	Mare	Enlarged Clitoris			XX
8	Cytogenetic Lab	Mare	Ambiguos genitalia	64,XX		XX
9	Cytogenetic Lab	Mare	Ambiguos genitalia	64,XX	64,XX	XX
10	DNA	Mare	Ambiguos genitalia			XX
11	DNA	Mare	Ambiguos genitalia			XX
12	Cytogenetic Lab	Mare	Gonadal dysgenesis	64,XY	64,XY	XY
13	Cytogenetic Lab	Mare	Gonadal dysgenesis	64,XY	64,XY	XY
14	Cytogenetic Lab	Mare	Gonadal dysgenesis	64,XY	64,XY	XY
15	Cytogenetic Lab	Mare	Gonadal dysgenesis	64,XY		XY
16	Cytogenetic Lab	Mare	Gonadal dysgenesis	64,XY		XY
17	Cytogenetic Lab	Mare	Gonadal dysgenesis	64,XY		XY
18	Cytogenetic Lab	Mare	Gonadal dysgenesis		64,XY	XY
19	Cytogenetic Lab	Mare	Gonadal dysgenesis		64,XY	XY
20	Cytogenetic Lab	Mare	Gonadal dysgenesis		64,XY	XY
21	DNA	Mare	Gonadal dysgenesis			XY
22	DNA	Mare	Gonadal dysgenesis			XY
23	DNA	Mare	Gonadal dysgenesis			XY
24	DNA	Mare	N.D.			XY
25	DNA	Mare	N.D.			XY

26	DNA	Mare	N.D.		XY
27	DNA	Mare	N.D.		XY
28	DNA	Mare	N.D.		XY
29	DNA	Mare	N.D.		XY
30	Cytogenetic Lab	Horse	Normal	53% 64,XY	XX/XY
31	Cytogenetic Lab	Horse	Normal	73% 64,XY	XX/XY
32	Cytogenetic Lab	Mare	Normal	70% 64,XY	XX/XY
33	Cytogenetic Lab	Mare	Normal	41% 64,XY	XX/XY

Tabla S3.1 Lista de los individuos con anomalías cromosómicas incluidas en este estudio.

GRUPO	ECA 10		PAR ECAX		NO PAR ECAX		ECAY
	HET	LRR	HET	LRR	HET	LRR	
HOM-Mare	23.27±6.84	0.00±0.26	20.19±12.20 ^A	0.02±0.36 ^A	10.63±2.97 ^b	0.01±0.27 ^A	NO
Mare	26.45±4.64	0.00±0.25	27.64±11.28 ^A	0.03±0.33 ^A	24.84±4.02 ^a	0.01±0.25 ^A	NO
Male	27.56±4.41	0.02±0.27	25.87±11.70 ^A	0.05±0.35 ^A	3.32±1.77 ^c	-0.41±0.28 ^c	SI
XO	30.16±1.11	0.04±0.32	1.92±2.72 ^B	-0.34±0.40 ^B	1.45±0.65 ^c	-0.39±0.30 ^c	NO
XXSR dsd	27.20±3.29	0.00±0.26	35.47±8.97 ^A	0.04±0.35 ^A	25.38±3.05 ^a	0.00±0.26 ^A	NO
XYSR dsd	28.27±3.37	0.02±0.28	23.50±11.03 ^A	0.10±0.36 ^A	2.22±1.98 ^c	-0.44±0.30 ^c	SI
XX/XY	25.01±3.23	-0.01±0.23	28.85±3.85 ^A	0.00±0.30 ^A	17.94±7.27 ^a	-0.21±0.23 ^B	SI

Tabla S3.2 Análisis de las medias de LRR y HET en 7 grupos de caballos PRE con diferentes cariotipos de sexo utilizando un conjunto de datos MD SNP. Los valores se expresan como SD media. Dentro de las columnas, diferentes superíndices muestran diferencias estadísticas a $P < 0,05$ (minúsculas) y $P < 0,01$ (mayúsculas).

GRUPO	ECA 10		PAR ECAX		NO PAR ECAX		ECAY
	HET	LRR	HET	LRR	HET	LRR	
HOM-Mare	23.656 ± 6.917	0.004 ± 0.26	23.75 ± 18.212 ^a	0.008 ± 0.358 ^a	10.765 ± 3.291 ^b	0.007 ± 0.268 ^a	NO
Mare	26.989 ± 4.899	0.003 ± 0.245	32.85 ± 21.906 ^a	0.053 ± 0.325 ^a	25.614 ± 4.497 ^a	0.001 ± 0.25 ^a	NO
Male	28.123 ± 4.576	0.013 ± 0.263	30 ± 20.237 ^a	0.051 ± 0.359 ^a	3.663 ± 2.166 ^c	-0.421 ± 0.287 ^c	SI
XO	31.285 ± 3.555	0.047 ± 0.301	0 ± 0 ^a	-0.217 ± 0.407 ^b	1.879 ± 0.59 ^c	-0.385 ± 0.299 ^c	NO
XXDSD	27.623 ± 4.389	-0.001 ± 0.259	35.556 ± 19.437 ^a	-0.002 ± 0.367 ^a	26.606 ± 3.427 ^c	-0.009 ± 0.262 ^a	NO
XYDSD	28.818 ± 4.062	0.013 ± 0.277	31.111 ± 18.436 ^a	0.088 ± 0.323 ^a	2.528 ± 2.116 ^c	-0.453 ± 0.307 ^c	SI
XX/XY	23.883 ± 4.754	-0.002 ± 0.224	35 ± 19.149 ^a	0.032 ± 0.332 ^a	19.207 ± 7.018 ^a	-0.217 ± 0.247 ^b	SI

Tabla S3.3 Análisis de las medias de LRR y HET en 7 grupos de caballos PRE con diferentes cariotipos de sexo utilizando un conjunto de datos LD SNP. Los valores se expresan como SD media. Dentro de las columnas, diferentes superíndices muestran diferencias estadísticas a $P < 0,05$ (minúsculas) y $P < 0,01$ (mayúsculas).

CAPÍTULO IV: Cuantificación del grado de quimerismo intersexual (64,XY/64,XX) en caballos utilizando datos de genotipado de polimorfismo de nucleótido único de densidad media

INTRODUCCIÓN

El quimerismo es una condición genética que se caracteriza por la fusión de dos o más líneas celulares, cada una con un origen genético distinto, en un solo individuo. Las dos formas más comunes de esta condición son: el quimerismo verdadero, resultante de la fusión de dos cigotos o embriones durante el desarrollo temprano en el útero materno, y el quimerismo (hematopoyético), causado por el intercambio de células sanguíneas entre fetos mellizos durante el desarrollo uterino temprano a través de anastomosis vasculares entre las placentas (Padula, 2005). La diferencia entre estos dos tipos es importante en los animales domésticos, ya que el quimerismo verdadero suele asociarse a anomalías fenotípicas graves (Batista y col., 2000; Dunn y col., 1970; Dunn y col., 1981), mientras que los efectos del quimerismo hematopoyético dependen de la especie. A modo de ejemplo, esta condición puede afectar negativamente a la fertilidad de las hembras bovinas y ovinas, pero los machos portadores siguen siendo fértiles (Brace y col., 2008; Peretti y col., 2008). En bovinos, esta condición da origen al síndrome "freemartin" (Padula, 2005). Este término se refiere a una hembra concebida dentro de una gestación múltiple que incluye individuos de ambos sexos, en la que en más del 92% de los casos se produce una anastomosis vascular placentaria antes de la diferenciación sexual, lo que da lugar a un intercambio de células

(quimerismo hematopoyético), así como también hormonas que producen una inhibición del desarrollo sexual de la hembra, la cual presenta genitales externos morfológicamente femeninos, mientras que los genitales internos no se desarrollan de manera normal (Naranjo y Robledo, 2000). Por el contrario, los caballos portadores reportados hasta la fecha fueron normales en términos de fertilidad, tanto en machos como en hembras (Anaya y col., 2018; Juras y col., 2010). Por otro lado, Albarella y col. (2018) informaron de una potra italiana *Saddlebred* que mostraba anomalías morfológicas con un grado muy bajo de quimerismo macho-hembra, que oscilaba entre el 0,25% y el 1,29%.

Dentro de las especies domésticas, el caballo es el animal que presenta un mayor grado de anomalías cromosómicas (Bugno, Słota, y Kościelny, 2007). Sin embargo, el quimerismo macho-hembra ha sido escasamente reportado, ya que las gestaciones múltiples se consideran patológicas, debido a su asociación con altas tasas de abortos y mortalidad perinatal, así como el riesgo de vida que presentan para la yegua (Jeffcott y Whitwell, 1973). Es por ello que es una práctica habitual el limitar uno de los dos sacos gestacionales en yeguas con gestaciones múltiples tan pronto sean detectados (Anne, 2009). Sin embargo, el seguimiento obstétrico no es una práctica común, por lo que se han dado casos de partos múltiples en equidos.

En el mismo sentido, el mosaicismo del par sexual (63,X/64,XX) (condición similar en la que se detectan líneas celulares portadoras de diferentes complementos cromosómicos en un mismo individuo) es uno de los síndromes de tipo CNA más comúnmente detectados en la especie (Lear y McGee, 2012). Si bien los datos son contradictorios, las yeguas con este mosaicismo son fenotípicamente normales, pero su rendimiento reproductivo se ve perjudicado, o bien por un subdesarrollo del tracto reproductivo (caracterizado por ovarios

muy pequeños y/o quísticos, cuerpos lúteos persistentes, atrofia endometrial y/o flacidez cervical) o bien por la presencia de ciclos irregulares o anestro prolongado de origen idiopático (Macfeely, 1990). En humanos, el grado de mosaicismo se relacionó parcialmente con la aparición de fenotipos anormales. Los individuos que muestran tasas elevadas de células anormales tienen más probabilidad de desarrollar un fenotipo anormal que aquellos con un grado bajo de mosaicismo (Rodríguez-Martin y col., 2020). Un estudio realizado por Moncaleano y col. (2007) en 4 yeguas entre 4 y 19 años de edad detectó diferentes grados de anormalidades celulares (25%-63% de 63,X) demostró que la hembra con un 25% de células anormales, su condición fenotípica era normal, pero presentaba celos irregulares y recién logró concebir luego de 2 temporadas completas. Por el contrario, las yeguas con 30%-43% de anormalidades también fueron fenotípicamente normales, pero mostraron una historia reproductiva variada, incluyendo abortos, producción de crías inmaduras o malformadas que mueren, así como crías normales. Este último caso ocurrió en el primer parto de la yegua con 43% de células anormales, que produjo una cría normal, siendo los 3 partos posteriores asociados a los problemas mencionados anteriormente. Más recientemente Pienkowska-Schelling y col. (2020) demostraron que los mosaicismos de bajo nivel en el par sexual (63,X/64,XX) son comunes en yeguas fértiles. Dado que el efecto del grado de quimerismo en el fenotipo de los caballos sigue sin estar claro, la existencia de una metodología semiautomatizada y fiable, capaz de cuantificar su extensión (basada en datos genómicos) podría ser una adición interesante como herramienta de diagnóstico existente para los caballos.

La identificación temprana de condiciones congénitas asociadas con cromosomas anormales (CNA) que pueden conducir a problemas reproductivos puede tener un impacto

significativamente positivo en la industria equina (Bugno-Poniewierska y Raudsepp, 2021). En consecuencia, la implementación de metodologías de detección basadas en el uso de la información genómica disponible a través de los programas de cría (Anaya y col., 2017; Pirosanto y col., 2021) ha surgido como una alternativa viable a los métodos de cariotipado clásico y molecular. Aunque las técnicas moleculares se han empleado con éxito para identificar la incidencia de individuos quiméricos dentro de una gran población de caballos (Anaya y col., 2018), su validez para cuantificar el grado de quimerismo en caballos individuales aún no se había probado.

En 2012, Markello y col. (2012) introdujeron una metodología novedosa denominada Análisis de distribución mediante ajuste de probabilidades integradas (DANFIP), que emplea datos de polimorfismo de nucleótido único (SNP) basados en *arrays* para cuantificar con precisión el porcentaje de mosaicismo en muestras humanas. Este algoritmo evalúa la distribución de las frecuencias alélicas B, que estima indirectamente la intensidad de la señal de hibridación de uno de los dos alelos en un locus SNP en relación con la intensidad total de la señal de ambos alelos. Al calcular las contribuciones relativas de las células haploides y diploides, DANFIP permite una cuantificación precisa del grado de mosaicismo. Sin embargo, los individuos quiméricos macho-hembra en el cromosoma X (ECAX en caballos) presentan complementos cromosómicos que se asemejan a los observados en los mosaicismos haploide/diploide, ya que una línea es hemicigótica y la otra diploide.

Partiendo de estas premisas, el presente estudio pretende validar la aplicabilidad de la metodología DANFIP para determinar el grado de quimerismo macho-hembra en muestras de caballos utilizando información genómica obtenida a partir de plataformas comerciales de genotipado SNP.

METODOLOGÍA

Muestras

Para verificar la precisión y fiabilidad de la metodología DANFIP para determinar el grado de quimerismo en caballos, establecimos inicialmente un conjunto de 5 muestras quiméricas 64,XY/64,XX experimentales con un grado de quimerismo conocido, mezclando cantidades conocidas de ADN obtenidas de una yegua y un macho (hermanos completos) de la raza PRE que presentaban un cariotipo normal.

Además, examinamos muestras de ADN de 18 caballos PRE: 6 yeguas normales (C1-C6), utilizadas como controles negativos y 12 individuos que habían sido diagnosticados previamente con quimerismo sanguíneo en el Laboratorio Citogenético y Molecular de la Universidad de Córdoba, España, utilizando la metodología descrita por Anaya y col. (2017). Además, todos los individuos de los que se disponía de muestras de sangre adecuadas (sangre fresca recolectada en tubos de heparina sodio, 6 controles y 4 casos) fueron cariotipados mediante cultivo de linfocitos, siguiendo nuestra metodología habitual (Demyda-Peyras, Bugno-Poniewierska, y col., 2013).

Extracción de ADN

La extracción de ADN se realizó con el kit DNeasy Blood & Tissue extraction kit, Qiagen, siguiendo las instrucciones del fabricante. La cantidad y la calidad del ADN se evaluaron con un espectrofotómetro NanoDrop™ (Thermo Scientific). Sólo las muestras que presentaban una relación Abs260/Abs280 y Abs260/Abs230 superior a 1,8 y 1,5 respectivamente y que

mostraban una banda clara de 10kb en una corrida electroforética en gel de agarosa al 1% se analizaron posteriormente mediante genotipado.

Genotipado mediante SNP-array

Las muestras se genotiparon utilizando el Equine GGP Genotyping Array (Neogen Europe Ltd, Irlanda), que consta de ~71000 marcadores. Los genotipos se determinaron siguiendo el procedimiento bioinformático estándar recomendado por el fabricante utilizando GenomeStudio v2.0 (Illumina Inc., San Diego, CA, EEUU.). El análisis incluyó la determinación del valor de la frecuencia alélica B (BAF) por muestra y locus, estimada directamente a partir de los resultados de intensidad de hibridación de dos conjuntos de sondas (uno por alelo, A y B), como sigue:

$$BAF = \log_2 \left(\frac{(iB)}{(irA + irB)} \right)$$

donde **iB** es la intensidad de hibridación detectada en el canal B en cada locus de cada muestra, e **irA** e **irB** son la mediana de la intensidad total para los alelos A y B en un conjunto de muestras de referencia seleccionadas (normales y diploides).

Cuantificación del grado de quimerismo mediante análisis de distribución de probabilidad integrada (DANFIP)

El grado de quimerismo (expresado como el porcentaje de células 64,XY por muestra) se determinó aplicando la metodología DANFIP desarrollada por Markello y col. (2012). Para ello, se crearon inicialmente cinco conjuntos de datos de función de distribución

acumulativa (CDF) de control seleccionando valores de BAF de al menos 3000 marcadores heterocigotos aleatorios de yeguas normales del cromosoma X. En un segundo paso, cada CDF se normalizó a un valor medio global de frecuencia alélica B de 0,5 y se ordenó para crear un control CDF atenuado. Al mismo tiempo, los valores de BAF de todos los marcadores SNP heterocigotos del cromosoma X que tenían valores comprendidos entre 0,15 y 0,85 de cada muestra experimental, se ordenaron de menor a mayor en función de su valor de BAF. Por último, este último conjunto de datos se comparó con el mismo número de marcadores SNP seleccionados al azar de la CDF mediante una serie de desplazamientos iterativos de datos utilizando un algoritmo de regresión no lineal (*solver*) en ExcellTM. La magnitud del desplazamiento que mejor se ajustaba al modelo de regresión (punto de convergencia) determinaba el porcentaje de quimerismo real. Una descripción detallada del procedimiento, así como las planillas para su desarrollo se hayan disponibles en la información suplementaria del manuscrito original de Markello y col. (2012). Todo el manejo, curación y filtrado de los datos se realizó utilizando el entorno estadístico R (Team, 2020)

Diseño experimental

Parte I: Validación de la metodología DANFIP utilizando muestras quiméricas experimentalmente producidas *in vitro*.

En primer lugar, validamos la fiabilidad del DANFIP analizando 5 muestras quiméricas 64,XY/64,XX producidas experimentalmente *in vitro* con un porcentaje 64,XY que oscilaba entre el 5% y el 50%. Para ello, combinamos cinco proporciones diferentes de ADN de un semental normal (64,XY) y una yegua normal (64,XX) para obtener: 5%, 15%, 25%, 35% y 50% de ADN 64,XX/64,XY. A fin de reducir la variable alélica e imitar las condiciones

existentes en el útero materno, el ADN utilizado perteneció a dos hermanos completos (mismo padre y madre). Las muestras resultantes se genotipificaron siguiendo los procedimientos descritos anteriormente y analizadas mediante la metodología DANFIP, utilizando los datos BAF del ECA10 (control autosómico) y ECAX de cada muestra. A fin de estimar la repetibilidad de las estimaciones, se realizaron 10 ejecuciones independientes de DANFIP para cada muestra. Por último, determinamos la correlación intraclase (repetibilidad) de la metodología utilizando el paquete de *heritability* (Kruijer, 2019) en el entorno estadístico R. La validez de las determinaciones realizadas con DANFIP se determinó mediante la comparación de los porcentajes esperados (de acuerdo con la cantidad de ADN de macho y hembra empleado) y los resultados contenidos mediante una prueba Z de proporciones en R

PARTE II: Utilización de DANFIP en equinos portadores de quimerismo sexual

En este experimento, aplicamos DANFIP para determinar el grado de quimerismo en 6 yeguas normales (controles) y 12 individuos diagnosticados previamente como quimeras sanguíneas macho/hembra (64,XY/64,XX). Adicionalmente, el porcentaje de líneas celulares 64,XY y 64,XX determinado se comparó con el obtenido por cariotipado en 6 controles y 4 individuos quiméricos de los cuales se obtuvieron datos citogenéticos.

RESULTADOS

Parte I: Validación del DANFIP en muestras quiméricas producidas *in vitro*.

La comparación entre el porcentaje de quimerismo esperado y el determinado mediante la aplicación de DANFIP se muestra en la Tabla 4.1. Las determinaciones obtenidas a partir del algoritmo fueron precisas en las cinco muestras que utilizaron datos ECAX (sin diferencias

estadística, $p > 0,05$, prueba Z). Sin embargo, el grado de quimerismo se sobrestimó en tres de las muestras en las que se utilizó la información ECA10 (muestras 2, 3 y 4; $p < 0,01$).

Además, el patrón BAF de los CDF sólo era similar al esperado según la metodología DANFIP en ECAX (Figura 4.1), mientras que los obtenidos utilizando datos de ECA10 estaban distorsionados.

Muestras	% de quimerismo determinado ECAX	% de quimerismo teórico	% de quimerismo determinado ECA 10
1	3.14±0.4% ^a	5% ^{aA}	2.86 ± 0.7% ^A
2	13.15±0.3% ^a	15% ^{aA}	20.68 ± 1.15 ^B %
3	22.59±0.9% ^a	25% ^{aA}	37.12 ± 0.8 ^B %
4	35.36±0.3% ^a	35% ^{aA}	47.51 ± 1.15 ^B %
5	46.60±0.8% ^a	50% ^{aA}	52.96 ± 1.41% ^A

Tabla 4.1: Cuantificación del grado de quimerismo determinado mediante DANFIP en las ECAX y ECA10 obtenidas de 5 muestras quiméricas 64,XY/64,XX producidas in vitro. Los resultados se expresan como media \pm ds de 10 determinaciones independientes por muestra. Las letras minúsculas y mayúsculas muestran las diferencias entre el porcentaje de quimerismo esperado y los resultados obtenidos del análisis de ECAX y ECA10 respectivamente (prueba Z para proporciones, $p < 0,001$).

La representación gráfica del diagrama de dispersión de frecuencias BAF de ECAX (Figura 4.2) muestra dos bandas características, compatibles con los genotipos híbridos (AAAB y AB BB) que se separan de acuerdo al % de quimerismo existente. Por el contrario, el análisis de los datos del ECA10 se observó una tercera banda central, compatible con los genotipos (AABB), que no está presente en una ECAX, al tratarse este de un cariotipo complejo desbalanceado (solo una de las líneas tiene dos cromosomas X). Es de hacer notar que el análisis de

repetibilidad intra-muestra fue de 0,994 y 0,997 al analizar los datos de ECAX y ECA10, respectivamente.

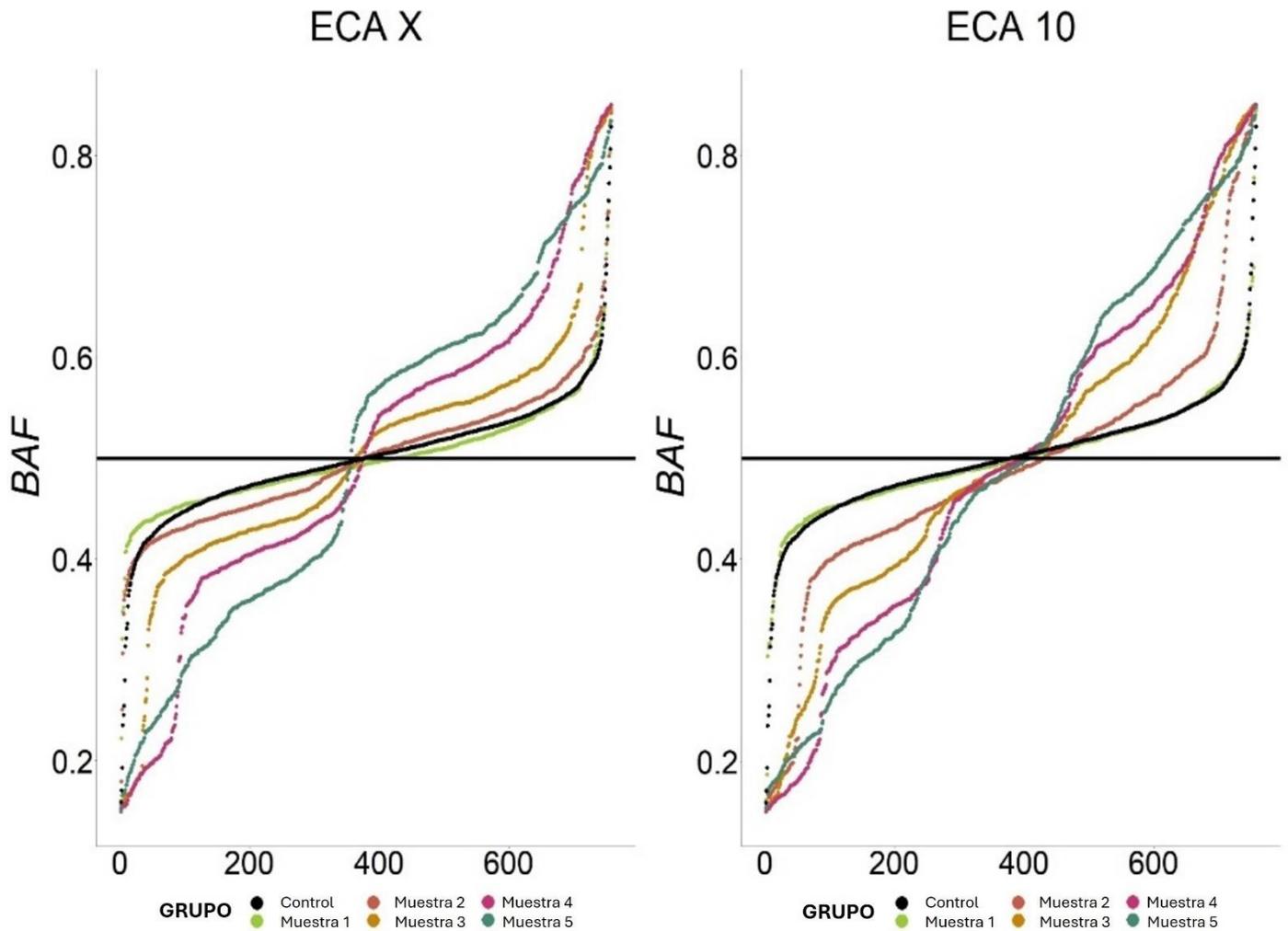


Figura 4.1. Análisis CDF de las cinco muestras químicas producidas in vitro con diferentes grados de quimerismo. El grafico de la izquierda corresponde al análisis de ECAX, mientras que el de la derecha hace referencia al análisis de ECA 10. Cada color representa los individuos con diferente grado de quimerismo.

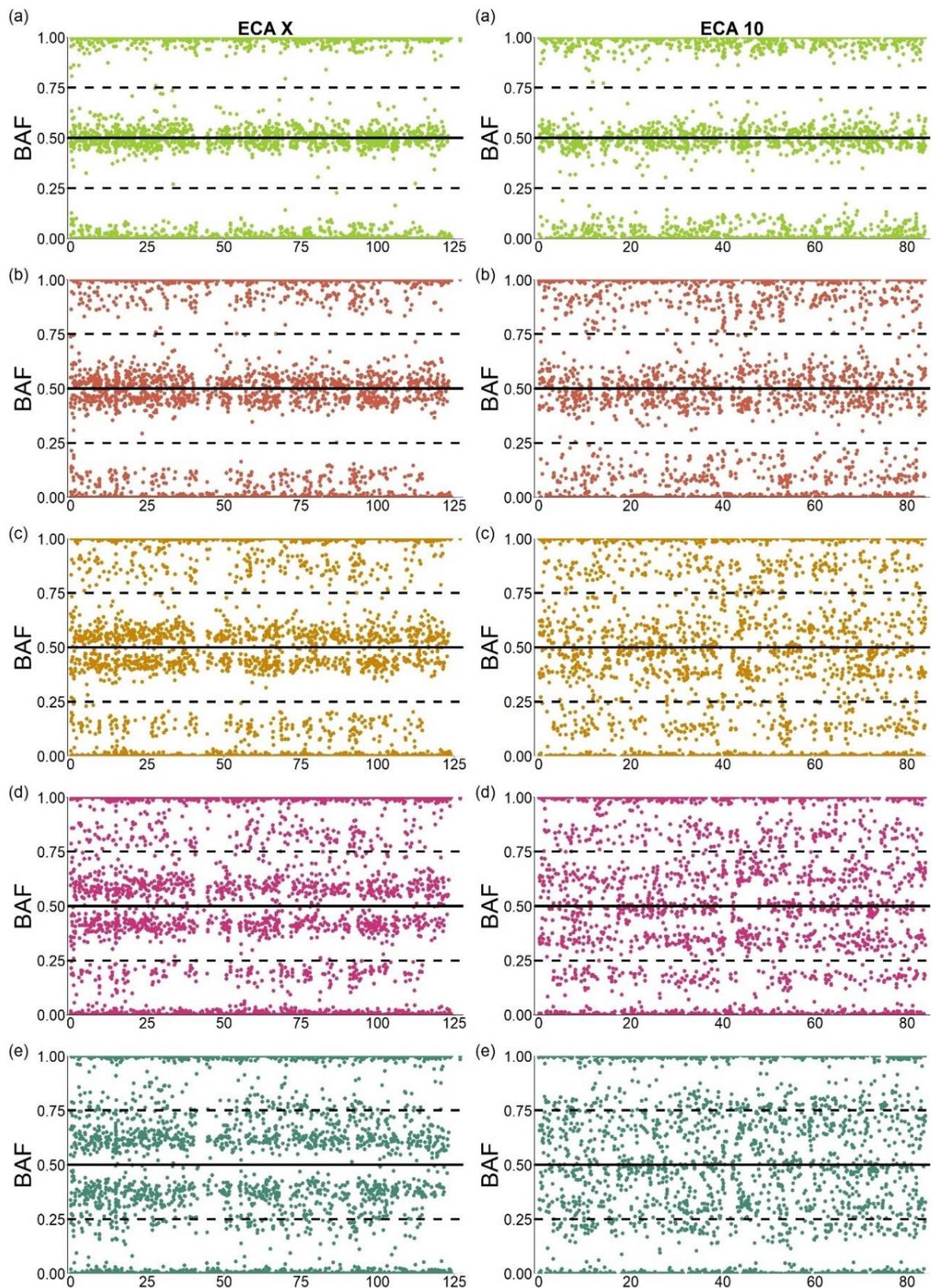


Figura 4.2. La figura muestra la distribución de BAF a la posición de SNPs en el cromosoma X (gráficos de la izquierda) y el cromosoma 10 (gráficos de la derecha) para los cinco caballos quiméricos

Parte II: Utilización del DANFIP en equinos portadores de quimerismo sexual

El grado de quimerismo estimado mediante la aplicación del DANFIP en las 6 yeguas normales utilizadas como controles (64,XX, C1 a C6) fue próximo a 0, mostrando sólo algunas ligeras desviaciones inferiores al 1% (Tabla 4.2). Por el contrario, los resultados obtenidos en los 12 individuos diagnosticados previamente como quimeras, 64,XY/64,XX oscilaron entre el 24,6% y el 51,2%. En ambos casos (individuos control y quiméricos) tanto los patrones CDF como los gráficos de dispersión BAF siguieron el patrón esperado (Figura 4.3).

Por último, la comparación entre los resultados del DANFIP y el cariotipo sólo mostró resultados similares en 2 individuos (IND 1 e IND 2) (Tabla 4.2 y Figura 4.3), siendo significativamente superior ($\sim 10\%$, $p < 0.05$) en los restantes 2 (IND 3 e IND 4).

Caballos	Analisis STR	% de quimerismo	Cariotipo
C 1		0	64,XX
C 2		0,3	64,XX
C3		0,1	64,XX
C 4		0	64,XX
C 5		0,7	64,XX
C 6		0	64,XX
IND 1	64,XY/64,XX	49,8 ^A	53% ^A
IND 2	64,XY/64,XX	39,3 ^A	41% ^A
IND 3	64,XY/64,XX	38,8 ^A	30% ^B
IND 4	64,XY/64,XX	37,6 ^A	27% ^B
IND 5	64,XY/64,XX	49,1	n.d
IND 6	64,XY/64,XX	51,1	n.d
IND 7	64,XY/64,XX	51,2	n.d
IND 8	64,XY/64,XX	34,3	n.d
IND 9	64,XY/64,XX	49,8	n.d
IND 10	64,XY/64,XX	36,6	n.d
IND11	64,XY/64,XX	24,6	n.d
IND 12	64,XY/64,XX	28,8	n.d

Tabla 4.2. Cuantificación del grado de quimerismo mediante DANFIP. Se muestran en la siguiente tabla los 6 controles negativos y 12 individuos 64,XY/64,XX previamente analizados. En cuatro casos se disponía de los resultados del cariotipo. Los individuos que no fueron cariotipados, se los codificó con la siglas (n.d). Las diferencias entre el DANFIP y el cariotipo se expresan como diferentes superíndices en mayúsculas (A,B; prueba de proporción Z, $P < 0,05$).

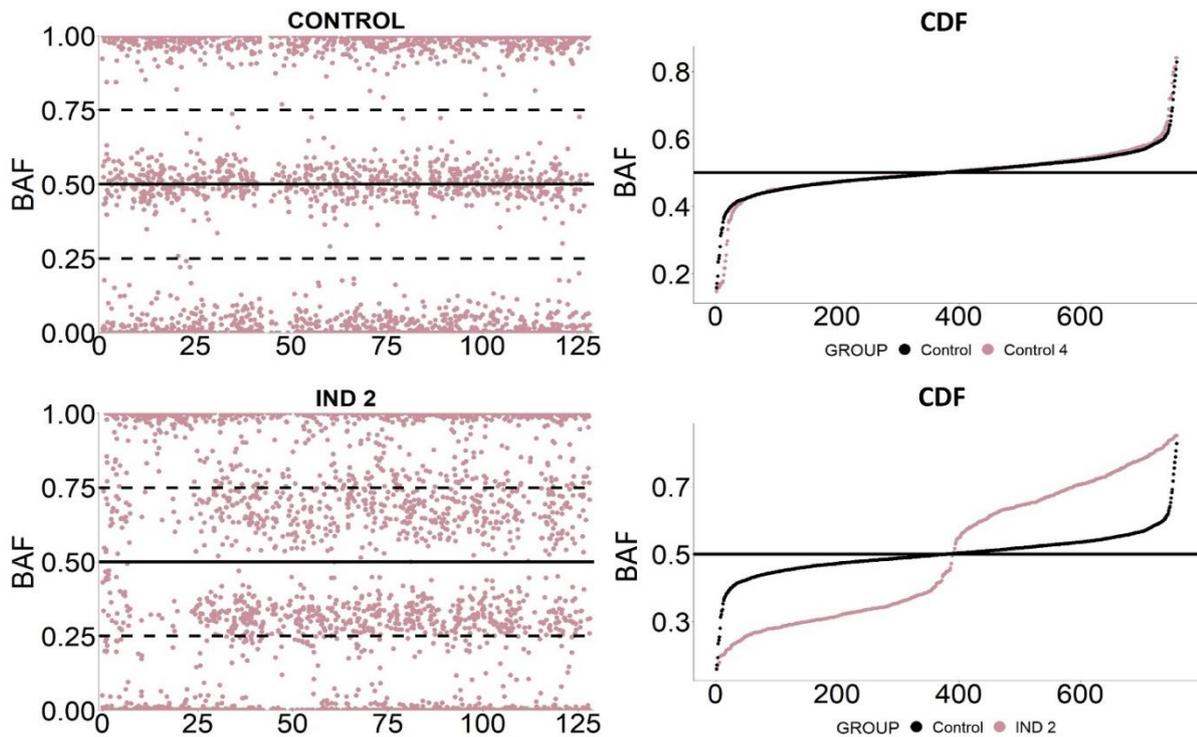


Figura 4.3. Diagrama de dispersión de los CDF del DANFIP. Se muestran los resultados del BAF obtenidos de ECAX de yegua normal (CONTROL 4) y de individuos quiméricos 64,XY/64,XX (IND 2). Los patrones CDF (a la derecha) muestran los resultados de CDF normalizada (negro) y CDF de caso (rosa).

DISCUSIÓN

El quimerismo en el par sexual es una anomalía cromosómica común que ha sido reportada en reiteradas ocasiones en caballos (Anaya y col., 2018; Demyda-Peyras y col., 2023; Juras y col., 2010). Hasta la fecha, su detección se ha realizado utilizando diferentes metodologías como el cariotipo clásico con tinción simple (Vandeplassche y col., 1970), la hibridación fluorescente *in situ* (FISH) mediante sondas específicas (Bugno, Słota, y Kościelny, 2007), y el análisis de perfiles STR y SNP (Juras y col., 2010; Pirosanto y col., 2021). Sin embargo, los métodos moleculares no tienen la capacidad de determinar el grado de quimerismo existente en un individuo dado de manera directa. En este estudio, hemos logrado cuantificar el grado de quimerismo celular en el par sexual de equinos portadores de cromosopatías adaptando un algoritmo de detección desarrollado para el análisis de

muestras humanas, para los datos producidos por las plataformas actualmente existentes en equinos. Siendo que genotipados de tipo SNP-array están cada vez más disponibles en caballos, debido al incremento en estudios genómicos-poblacionales (McGivney y col., 2020), pero también debido a la creciente implementación del control de parentesco basado en SNP (Nolte y col., 2022), la detección y cuantificación sistemática de este tipo de CNA en caballos mediante análisis bioinformáticos puede ir en aumento. En este contexto, una metodología validada para determinar y cuantificar el grado de quimerismo en caballos sería una valiosa adición a las metodologías genómicas disponible actualmente en la especie.

Nuestro estudio demostró que se pueden obtener resultados fiables aplicando DANFIP en muestras con un grado de quimerismo conocido, pero solo utilizando la información obtenida de ECAX. Este resultado era de esperar, dado que DANFIP está diseñado para evaluar la presencia de CNA's de tipo monosomía/disomía. En los individuos quiméricos, esta configuración cromosómica es exclusiva de ECAX (monosomía en los machos y disomía en las hembras). Por el contrario, la combinación de dos líneas celulares en los autosomas produce un conjunto cromosómico disómico/disómico, dando lugar a resultados distorsionados caracterizados por la presencia de tres bandas distintivas en el diagrama de dispersión de frecuencias BAF (una por línea celular y una adicional cercana a 0). Este tipo de patrones ya fueron descritos previamente en esta tesis doctoral (Capítulo 3 (Pirosanto y col., 2021)). Por el contrario, solo se observaron dos bandas distintivas en el ECAX, lo que se alinea con el patrón esperado en los diagramas de dispersión BAF de muestras en mosaico (Vattathil y Scheet, 2013).

Los términos mosaicismo y quimerismo describen una condición genética en la que una muestra dada contiene dos líneas celulares con diferentes antecedentes genéticos. Sin

embargo, sus orígenes difieren entre ambas condiciones. En el mosaicismo, las células proceden del mismo cigoto y las diferencias se deben a deleciones o duplicaciones. Por el contrario, en el quimerismo, las diferencias se originan a partir de dos cigotos o fetos. A pesar de estas diferencias, nuestro estudio demuestra que la metodología que empleamos puede determinar y cuantificar de forma fiable el grado de quimerismo en los cromosomas del par sexual. Estos hallazgos son especialmente relevantes, ya que cada vez se dispone de más animales genotipados (incluso con estudios que llegan a los 10.000 animales (McGivney y col., 2020)), en particular en estudios de poblaciones de consanguinidad y de la implementación del control de parentesco mediante marcadores SNP.

Además, cabe mencionar que este estudio se realizó utilizando la plataforma estadística abierta R (para el manejo de datos) y la hoja de cálculo Excel™ (utilizando el complemento Solver). Ambas son gratuitas (para fines científicos) y de fácil uso, permitiendo la reproducibilidad e implementación de este método. Como tal, la inclusión de estas herramientas analíticas podría ser de gran interés en los laboratorios de citogenética animal, especialmente dado el actual aumento en el número de individuos que están siendo genotipados utilizando tecnologías basadas en SNP-array.

Precisión de DANFIP en muestras quiméricas conocidas y desconocidas

Aunque nuestro estudio reveló que los resultados de las muestras producidas in vitro coincidían con el porcentaje de quimerismo esperado para el par de cromosomas sexuales, se observaron algunas desviaciones. Similares resultados no son exclusivas de las poblaciones equinas, ya que también se han observado cambios similares en las intensidades normales de la señal de cigotos en humanos, debido a diversos factores como

la amplificación de la PCR y la metodología (Markello y col., 2012). Para abordar estas posibles fuentes de variabilidad, empleamos una función de distribución acumulativa para detectar la tendencia central y mejorar la precisión del grado de quimerismo presente en las muestras. Dado que las intensidades de fluorescencia de los *arrays* SNP representan datos aleatorios casi normalizados, este enfoque ofrece un medio más preciso para determinar el grado de quimerismo en las muestras de ADN. Sin embargo, es importante señalar que deben tenerse en cuenta cuestiones técnicas, como el impacto de la calidad del ADN en los resultados de hibridación durante el genotipado SNP (Baugher y col., 2013), así como la precisión de la plataforma de genotipado SNP para proporcionar resultados fiables (Verlouw y col., 2021).

Un problema importante en la detección y cuantificación del quimerismo por métodos moleculares en caballos es la existencia de individuos con un número muy bajo de células anormales (Szczerbal y col., 2020). Nuestros resultados mostraron un grado de quimerismo cercano a 0 en los controles, lo que implica que este método puede detectar fácilmente animales normales (no quiméricos). Sin embargo, a pesar de que detectamos individuos y muestras con bajos niveles de quimerismo, la cuantificación fue menos precisa (alrededor del 35%) de lo esperado en animales con bajo nivel de células anormales; en comparación con aquellos en los que el grado de quimerismo era alto, en los que la precisión aumenta significativamente. A pesar de que se ha informado de que la precisión y exactitud de DANFIP es tan baja como el 0,1% en muestras humanas (Markello y col., 2012), nuestros resultados no alcanzaron dichos niveles de precisión en los ensayos *in vitro*. La causa más plausible es la limitada calidad del genotipado de los SNP-array comerciales de caballos

actualmente disponibles, que está muy por detrás de la calidad obtenida en genotipos humanos (Schaefer y McCue, 2020).

Por ese motivo, sugerimos que los resultados de DANFIP se complementen con el uso de cariotipos clásicos o moleculares en individuos quiméricos de bajo nivel para evitar resultados falsos negativos (Albarella y col., 2018).

Utilizando DANFIP, pudimos cuantificar el grado de quimerismo en 12 caballos con cariotipo 64,XX/64,XY, que presentaban porcentajes que oscilaban entre el 24% y el 51%. En ocho de ellos, sólo se disponía de muestras de ADN, lo que impidió realizar el cariotipo y nos permitió únicamente determinar la repetibilidad del algoritmo (>99% en todos los casos). Sin embargo, en los cuatro individuos restantes se habían realizado el cariotipo. Nuestros resultados mostraron que sólo dos coincidían plenamente con el cariotipo, los dos restantes presentaban porcentajes de células 64,XY que eran ~10% inferiores en el cariotipo cuando se comparaban con el DANFIP. Estas diferencias podrían haberse producido por el "ruido" generado por la falta de calidad en los datos de genotipado. Sin embargo, las cuantificaciones del ADN empleado fueron en todos los casos satisfactorias, así como los niveles de calidad de los genotipos obtenidos. Otra posibilidad es que el análisis DANFIP se realiza sobre ADN obtenido de muestras de sangre no-cultivadas, mientras que el análisis mediante cariotipo incluye una incubación de los linfocitos durante 72 horas en condiciones *in vitro* durante las cuales, estos se reproducen mediante mitosis entre 3 y 5 veces en promedio. Dado que se ha establecido que algunas líneas celulares pueden proliferar a un ritmo más lento que otras, incluso en muestras quiméricas (Gajecka, 2016; Markello y col., 2012); esta reproducción diferencial podría ser una de las causas de los resultados discordantes en algunos de los animales analizados.

CONCLUSIONES SOBRE ANOMALÍAS CROMOSÓMICAS

En el capítulo III se analizó la detección de alteraciones del número de copias cromosómicas en el caballo doméstico mediante datos de genotipado de matrices SNP. A partir de los datos obtenidos pudimos concluir que la endogamia no alteró nuestra capacidad de detección de CNA. Este es un hallazgo importante en caballos, ya que los niveles de consanguinidad suelen ser altos (Petersen y col., 2013), pero especialmente en la raza PRE, donde no es difícil encontrar individuos con $F > 25\%$ (Perdomo-Gonzalez y col., 2020). Pusimos a prueba la hipótesis en un pequeño conjunto de datos de yeguas con valores extremos de FROHX (superiores al 50%), donde la mayoría de los SNPs empleados en el análisis eran monomórficos y no informativos. Sin embargo, el gran número de SNP empleados en cada cromosoma analizado (incluso en los conjuntos de datos MD y LD) ha reducido la probabilidad de obtener un CNA erróneo por azar debido a la aparición de un patrón homocigótico en toda una región cromosómica.

En resumen, hemos desarrollado una técnica analítica sencilla y robusta para detectar algunas de las anomalías cromosómicas más importantes notificadas en caballos mediante el análisis de los datos de intensidad bruta producidos por *arrays* de genotipado basados en SNP. También hemos demostrado que esta metodología puede llevarse a cabo utilizando chips de genotipado de densidad alta y media, y en individuos con valores de consanguinidad elevados, sin que ello afecte a su precisión. Dado que la metodología se utiliza en un entorno bioinformático abierto y flexible, su integración en los flujos de trabajo y los programas de cría es perfectamente factible.

Finalmente, en el capítulo IV, se realizó la cuantificación del grado de quimerismo intersexual (64,XY/64,XX) en caballos utilizando datos de genotipado de polimorfismo de nucleótido simple con chip de mediana densidad. Nuestros resultados indican que la metodología DANFIP podría ser una valiosa adición a herramientas de citogenética molecular para caballos, permitiendo la determinación precisa del porcentaje de quimerismo en caballos 64,XX/64,XY. No obstante, es necesario más investigaciones para evaluar la capacidad del método para detectar la presencia de quimerismo en individuos con porcentajes muy bajos de células anormales o en otro tipo de CNA complejo como el caso de los mosaicismos sexuales 63,X/64,XX.

CONCLUSIÓN GENERAL

En esta tesis doctoral se ha evaluado el efecto de las bases genéticas que modulan la aparición de fallas reproductivas en la especie equina causadas por un descenso de la calidad espermática o por la presencia de anomalías cromosómicas. Comprender cómo las anomalías cromosómicas y la calidad del esperma afectan la fertilidad en los equinos, permitirá desarrollar estrategias de reproducción más efectivas. Esto podría mejorar la tasa de fertilidad y reducir los problemas reproductivos en la cría equina. Por otro lado, permitirá a los criadores seleccionar los mejores reproductores para mejorar la calidad genética de la descendencia y de esta manera reducir la pérdida económica.

REFERENCIAS

1. Abah, K. O., Fontbonne, A., Partyka, A., Nizanski, W. 2023. Effect of male age on semen quality in domestic animals: potential for advanced functional and translational research? *Vet Res Commun*, 47(3), 1125-1137. doi:10.1007/s11259-023-10159-1
2. Adamou, A., Arantxa, E., Olga, M. 2012. Seminal Characteristics in Spanish Purebred Stallions: A Retrospective Study. *Journal of Equine Veterinary Science*. doi:10.1016/j.jevs.2012.09.002
3. Aitken, R. J., Lambourne, S., Medica, A. J. 2023. Predicting the outcome of Thoroughbred stallion matings on the basis of dismount semen sample analyses. *Reproduction*, 165(3), 281-288. doi:10.1530/REP-22-0309
4. Albarella, S., De Lorenzi, L., Catone, G., Magi, G. E., Petrucci, L., Vullo, C., Peretti, V. 2018. Diagnosis of XX/XY Blood Cell Chimerism at a Low Percentage in Horses. *Journal of Equine Veterinary Science*, 69, 129-135. doi:10.1016/j.jevs.2018.06.016
5. Aliloo, H., Pryce, J. E., González-Recio, O., Cocks, B. G., Hayes, B. J. 2015. Validation of markers with non-additive effects on milk yield and fertility in Holstein and Jersey cows. *BMC Genetics*, 16(1). doi:10.1186/s12863-015-0241-9
6. Allen, W. R., Wilsher, S. 2018. Half a century of equine reproduction research and application: A veterinary tour de force. *EQUINE VETERINARY JOURNAL*, 50(1), 10-21. doi:10.1111/evj.12762
7. Amann, R. P. 2006. The fertility dilemma: Perception vs. actuality. *Equine Veterinary Education*, 18(3), 159-164. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-33745188211&partnerID=40md5=027af204779996a8d607451f72d9f5e>
8. Anaya, G., Fernandez, M. E., Valera, M., Molina, A., Azcona, F., Azor, Demyda-Peyras, S. 2018. Prevalence of twin foaling and blood chimaerism in purebred Spanish horses. *The Veterinary Journal*, 234, 142-144. doi:10.1016/j.tvjl.2018.02.011
9. Anaya, G., Molina, A., Valera, M., Moreno-Millan, M., Azor, P., Peral-Garcia, P., Demyda-Peyras, S. 2017. Sex chromosomal abnormalities associated with equine infertility: validation of a simple molecular screening tool in the Purebred Spanish Horse. *Animal Genetic*, 48(4), 412-419. doi:10.1111/age.12543

10. Anaya, G., Moreno-Millán, M., Bugno-Poniewierska, M., Pawlina, K., Membrillo, A., Molina, A., Demyda-Peyrás, S. 2014. Sex reversal syndrome in the horse: Four new cases of feminization in individuals carrying a 64,XY SRY negative chromosomal complement. *Animal Reproduction Science*, 151(1-2), 22-27. doi:10.1016/j.anireprosci.2014.09.020
11. Anne, S. J. 2009. Diagnosis and management off twinning in mares. *In Practice*, 31(5), 226-231.
12. Atroshchenko M. M., Kudlaeva A.M., Fomina M.A., Kalashnikov V.V., Zaitcev A.M., Denisova O.V., . . . A.A., P. 2019. Analysis of seminal plasma biochemical parameters and sperm cryostability in different age groups of stallions. *IOP Conf. Series: Earth and Environmental Science* 341 012162. doi:doi:10.1088/1755-1315/341/1/012162
13. Aurich, J. E. 2012. Artificial Insemination in Horses-More than a Century of Practice and Research. *Journal of Equine Veterinary Science*, 32(8), 458-463. doi:10.1016/j.jevs.2012.06.011
14. Avila, F., Mickelson, J. R., Schaefer, R. J., McCue, M. E. 2018. Genome-wide signatures of selection reveal genes associated with performance in American Quarter Horse subpopulations. *Frontiers in Genetics*, 9(JUL). doi:10.3389/fgene.2018.00249
15. Azcona, F. 2023. *Caracterización genética del caballo Polo Argentino mediante el análisis de datos genealógicos y de polimorfismos de nucleótido simple*. (Phd). Universidad Nacional de La Plata,
16. Bannasch, D., Rinaldo, C., Millon, L., Latson, K., Spangler, T., Hubberty, S., Lowenstine, L. 2007. SRY negative 64,XX intersex phenotype in an American saddlebred horse. *Veterinary Journal*, 173(2), 437-439. doi:10.1016/j.tvjl.2005.11.008
17. Barbas, J. P., Leahy, T., Horta, A. E., Garcia-Herreros, M. 2018. Sperm kinematics and subpopulational responses during the cryopreservation process in caprine ejaculates. *Cryobiology*, 82, 137-147. doi:10.1016/j.cryobiol.2018.03.005
18. Barreto, M., Fagundes, B., Ferreira, V., Maurício, F., Shimoya, A., Silva, J. 2010. Adição de insulina ao meio crioprotetor seminal de garanhões Mangalarga Marchador. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 39(2), 273-278.
19. Batista, M., González, F., Cabrera, F., Palomino, E., Castellano, E., Calero, P., Gracia, A. 2000. True hermaphroditism in a horned goat with 60XX/60XY chimerism. *Canadian Veterinary Journal*, 41(7), 562-564.

20. Baugher, J., Baugher, B., Shirley, M., Pevsner, J. 2013. Sensitive and specific detection of mosaic chromosomal abnormalities using the Parent-of-Origin-based Detection (POD) method. *BMC Genomics*, 14, 367. Retrieved from <http://www.biomedcentral.com/1471-2164/14/367>
21. Beeson, S. K., Schaefer, R. J., Mason, V. C., McCue, M. E. 2019. Robust remapping of equine SNP array coordinates to EquCab3. *Animal Genetic*, 50(1), 114-115. doi:10.1111/age.12745
22. Berry, D. P., Wolfe, A., O'Donovan, J., Byrne, N., Sayers, R. G., Dodds, K. G., Purfield, D. C. 2017. Characterization of an X-chromosomal non-mosaic monosomy (59, X0) dairy heifer detected using routinely available single nucleotide polymorphism genotype data. *Journal of Animal Science*, 95(3), 1042-1049. doi:10.2527/jas.2016.1279
23. Betancur, G. R., Rodas, K. B., Suarez, A. U. 2023. Relationship of semen quality to inbreeding and gait of Colombian Creole horses. *Ciência Rural*, 53(3). doi:10.1590/0103-8478cr20210703
24. Biscarini, F., Cozzi, P., Gaspa, G., Marras, G. 2018. DetectRUNS: Detect runs of homozygosity and runs of heterozygosity in diploid genomes in R. Retrieved from <https://github.com/bioinformatics-ptp/detectRUNS/tree/master/detectRUNS>
25. Boer, M. 2007. *Effects of inbreeding on semen quality of Friesian stallions*. (Major thesis Animal Breeding and Genetics (ABG-8043),). Animal Breeding and Genomics Centre, Wageningen University.
26. Boerma, S., Back, W., Sloet van Oldruitenborgh-Oosterbaan, M. M. 2012. The Friesian horse breed: A clinical challenge to the equine veterinarian? *Equine Veterinary Education*, 24(2), 66-71. doi:10.1111/j.2042-3292.2011.00302.x
27. Bolormaa, S., Gore, K., van der Werf, J. H., Hayes, B. J., Daetwyler, H. D. 2015. Design of a low-density SNP chip for the main Australian sheep breeds and its effect on imputation and genomic prediction accuracy. *Anim Genet*, 46(5), 544-556. doi:10.1111/age.12340
28. Bowling, A. T., Millon, L. V. 1990. Two autosomal trisomies in the horse: 64,XX,-26,+t(26q26q) and 65,XX,+30. *Genome*, 33(5), 679-682.

29. Brace, M. D., Peters, O., Menzies, P., King, W. A., Nino-Soto, M. I. 2008. Sex chromosome chimerism and the freemartin syndrome in Rideau Arcott sheep. *Cytogenet Genome Res*, 120(1-2), 132-139. doi:000118752 10.1159/000118752
30. Breen, M., Langford, C. F., Carter, N. P., Fischer, P. E., Marti, E., Gerstenberg, C., Binns, M. M. 1997. Detection of equine X chromosome abnormalities in equids using a horse X whole chromosome paint probe (WCPP). *Veterinary Journal*, 153(3), 235-238.
31. Bubeníčková, F., Šichtař, J., Nováčková, L., Sirohi, J., Šimoník, O. 2020. The structure of subpopulations of stallion spermatozoa after thawing differs between good and poor freezers. *Czech Journal of Animal Science*, 65(11), 403-410. doi:10.17221/127/2020-cjas
32. Bugno-Poniewierska, M., Raudsepp, T. 2021. Horse Clinical Cytogenetics: Recurrent Themes and Novel Findings. *Animals (Basel)*, 11(3). doi:10.3390/ani11030831
33. Bugno, M., Słota, E., Kościelny, M. 2007. Karyotype evaluation among young horse populations in Poland. *Schweizer Archiv fur Tierheilkunde*, 149(5), 227-232. doi:10.1024/0036-7281.149.05.227
34. Bugno, M., Słota, E., Pieńkowska-Schelling, A., Schelling, C. 2007. Detection of equine X chromosome mosaicism in a mare using an equine X whole chromosome painting probe (WCPP) - A case report. *Acta Veterinaria Hungarica*, 55(2), 207-212. doi:10.1556/AVet.55.2007.2.6
35. Bugno, M., Słota, E., Zabek, T. 2001. Two cases of subfertile mares with 64,XX/63,X mosaic karyotype. *Annals of Animal Science*, 1, 7-11.
36. Chang, T., Zhao, G. 2021. Ice Inhibition for Cryopreservation: Materials, Strategies, and Challenges. *Adv Sci (Weinh)*, 8(6), 2002425. doi:10.1002/advs.202002425
37. Charlesworth, B., Charlesworth, D. 1999. The genetic basis of inbreeding depression. *Genetical Research*, 74(3), 329-340. doi:10.1017/s0016672399004152
38. Chowdhary, B. P., Raudsepp, T. 2000. Cytogenetics and physical gene maps. *The Genetics of the Horse*, 171-242.
39. Clavijo Barrera, V. 2015. *Evaluación de dos diluyentes comerciales en el proceso de criopreservación de células espermáticas de caballos Pura Raza Española de entre 6 y 10 años- Ecuador*. UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO,
40. Cole, J. B. 2024. Perspective: Can we actually do anything about inbreeding? *J Dairy Sci*, 107(2), 643-648. doi:10.3168/jds.2023-23958

41. Cothran, E., MacCluer, J., Weitkamp, L., Pfennig, D., Boyce, A. 1984. Inbreeding and reproductive performance in Standardbred horses. *Journal of Heredity*, 75, 220-224.
42. Curik, I., Ferenčaković, M., Sölkner, J. 2014. Inbreeding and runs of homozygosity: A possible solution to an old problem. *Livestock Science*, 166(1), 26-34. doi:10.1016/j.livsci.2014.05.034
43. Demyda-Peyras, S., Bugno-Poniewierska, M., Pawlina, K., Anaya, G., Moreno-Millán, M. 2013. The use of molecular and cytogenetic methods as a valuable tool in the detection of chromosomal abnormalities in horses: A Case of sex chromosome chimerism in a Spanish Purebred colt. *Cytogenetic and Genome Research*, 141, 277-283.
44. Demyda-Peyras, S., Gonzales Martinez, A., Rodero Franganillo, A., Rodro Serrano, E., Moreno-Millan, M. 2014. The 1;29 robertsonian translocation in andalusian indigenous breeds cattle. *Chromosome Research*, 22(3), 401-402. Retrieved from <Go to ISI>://WOS:000340534700028
45. Demyda-Peyras, S., Laseca, N., Anaya, G., Kij-Mitka, B., Molina, A., Karlau, A., Valera, M. 2023. Prevalence of Sex-Related Chromosomal Abnormalities in a Large Cohort of Spanish Purebred Horses. *Animals (Basel)*, 13(3). doi:10.3390/ani13030539
46. Demyda-Peyrás, S., Laseca, N., Anaya, G., Kij-Mitka, B., Molina, A., Karlau, A., Valera, M. 2023. Prevalence of Sex-Related Chromosomal Abnormalities in a Large Cohort of Spanish Purebred Horses. *Animals*, 13(3). doi:10.3390/ani13030539
47. Demyda-Peyras, S., Membrillo, A., Bugno-Poniewierska, M., Pawlina, K., Anaya, G., Moreno-Millan, M. 2013. The use of molecular and cytogenetic methods as a valuable tool in the detection of chromosomal abnormalities in horses: a case of sex chromosome chimerism in a Spanish purebred colt. *Cytogenet Genome Res*, 141(4), 277-283. doi:10.1159/000351225
48. Dini, P., Bartels, T., Revah, I., Claes, A. N., Stout, T. A. E., Daels, P. 2020. A retrospective study on semen quality parameters from four different Dutch horse breeds with different levels of inbreeding. *Theriogenology*, 157, 18-23. doi:10.1016/j.theriogenology.2020.07.017
49. Doekes, H. P., Bijma, P., Windig, J. J. 2021. How Depressing Is Inbreeding? A Meta-Analysis of 30 Years of Research on the Effects of Inbreeding in Livestock. *Genes (Basel)*, 12(6). doi:10.3390/genes12060926

50. Dorado, J., Cid, R. M., Molina, A., Hidalgo, M., Ariza, J., Moreno-Millan, M., Demyda-Peyras, S. 2017. Effect of inbreeding depression on bull sperm quality and field fertility. *Reprod Fertil Dev*, 29(4), 712-720. doi:10.1071/RD15324
51. Dowle, M., Srinivasan, A. 2019. data.table: Extension of data.frame.
52. Dowsett, K. F., Knott, L. M. 1996. THE INFLUENCE OF AGE AND BREED ON STALLION SEMEN. *Theriogenology*, 46, 397-412. doi:doi.org/10.1016/0093-691X(96)00162-8
53. Ducro, B. 2011. *Relevance of test information in horse breeding*. (Ph). Wageningen University,
54. Ducro, B. 2011. *Relevance of test information in horse breeding*. Wagenigen University,
55. Ducro, B. J., Schurink, A., Bastiaansen, J. W., Boegheim, I. J., van Steenbeek, F. G., Vos-Loohuis, M., . . . Leegwater, P. A. 2015. A nonsense mutation in B3GALNT2 is concordant with hydrocephalus in Friesian horses. *BMC Genomics*, 16, 761. doi:10.1186/s12864-015-1936-z
56. Dunn, H. O., McEntee, K., Hansel, W. 1970. Diploid-triploid chimerism in a bovine true hermaphrodite. *Cytogenetics*, 9(4), 245-259. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0014724468&partnerID=40&md5=73b6a52c69ad232fe40bcc80c601b64e>
57. Dunn, H. O., Smiley, D., Duncan, J. R., McEntee, K. 1981. Two equine true hermaphrodites with 64,XX/64,XY and 63,XO/64,XY chimerism. *The Cornell veterinarian*, 71(2), 123-135. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0019558704&partnerID=40&md5=b1aa86f584702a09dcae9ad63212d576>
58. Dürig, N., Jude, R., Holl, H., Brooks, S. A., Lafayette, C., Jagannathan, V., Leeb, T. 2017. Whole genome sequencing reveals a novel deletion variant in the KIT gene in horses with white spotted coat colour phenotypes. *Animal Genetics*. doi:10.1111/age.12556
59. FAHY, G. M. 1986. The Relevance of Cryoprotectant "Toxicity" to Cryobiology. *Cryobiology*, 23, 1-13.
60. Fisher, R. A. 1954. A Fuller Theory of Junctions in Inbreeding. *Heredity*, 8(2), 187-197. doi:10.1038/hdy.1954.17
61. Frischknecht, M., Signer-Hasler, H., Leeb, T., Rieder, S., Neuditschko, M. 2016. Genome-wide association studies based on sequence-derived genotypes reveal new QTL

- associated with conformation and performance traits in the Franches-Montagnes horse breed. *Animal Genetics*, 47(2), 227-229. doi:10.1111/age.12406
62. Gacem, S., Valverde, A., Catalan, J., Yanez Ortiz, I., Soler, C., Miro, J. 2021. A New Approach of Sperm Motility Subpopulation Structure in Donkey and Horse. *Frontiers in Veterinary Science*, 8, 651477. doi:10.3389/fvets.2021.651477
63. Gadea, J. 2005. Sperm factors related to in vitro and in vivo porcine fertility. *Theriogenology*, 63(2 SPEC. ISS.), 431-444. doi:10.1016/j.theriogenology.2004.09.023
64. Gajecka, M. 2016. Unrevealed mosaicism in the next-generation sequencing era. *Molecular Genetics and Genomics*, 291(2), 513-530. doi:10.1007/s00438-015-1130-7
65. Gamboa, S., Machado-Faria, M., Ramalho-Santos, J. 2009. Seminal traits, suitability for semen preservation and fertility in the native Portuguese horse breeds Puro Sanguê Lusitano and Sorraia: Implications for stallion classification and assisted reproduction. *Animal Reproduction Science*, 113(1-4), 102-113. doi:10.1016/j.anireprosci.2008.06.004
66. Gamo, S., Tozaki, T., Kakoi, H., Hirota, K.-i., Nakamura, K., Nishii, N., Takasu, M. 2018. X monosomy in the endangered Kiso horse breed detected by a parentage test using sex chromosome linked genes and microsatellites. *Journal of Veterinary Medical Science, advpub*. doi:10.1292/jvms.18-0253
67. Garcia-Herreros, M., Leal, C. L. 2014. Sperm morphometry: a tool for detecting biophysical changes associated with viability in cryopreserved bovine spermatozoa. *Andrologia*, 46(7), 820-822. doi:10.1111/and.12141
68. Gil, M. C., Garcia-Herreros, M., Baron, F. J., Aparicio, I. M., Santos, A. J., Garcia-Marin, L. J. 2009. Morphometry of porcine spermatozoa and its functional significance in relation with the motility parameters in fresh semen. *Theriogenology*, 71(2), 254-263. doi:10.1016/j.theriogenology.2008.07.007
69. Gomendio, M., Cassinello, J., Roldan, E. R. 2000. A comparative study of ejaculate traits in three endangered ungulates with different levels of inbreeding: fluctuating asymmetry as an indicator of reproductive and genetic stress. *Proc Biol Sci*, 267(1446), 875-882. doi:10.1098/rspb.2000.1084
70. Gomez, M. D., Sanchez, M. J., Bartolome, E., Cervantes, I., Poyato-Bonilla, J., Demyda-Peyras, S., Valera, M. 2020. Phenotypic and genetic analysis of reproductive traits in

- horse populations with different breeding purposes. *Animal*, 14(7), 1351-1361. doi:10.1017/S1751731120000087
71. Goncalves, A. R., Telo da Gama, L., Antunes, L., Guimaraes, H., Bliebernicht, M., Duarte, J. C., . . . Bettencourt, E. 2023. Impact of inbreeding and genetic parameter estimates for seminal traits in Lusitano horses. *Theriogenology*, 208, 43-51. doi:10.1016/j.theriogenology.2023.05.011
72. González Villalobos, D., Quintero-Moreno, A., Garde López-Brea, J. J., Estesó, M. C., Rocío Fernández-Santos, M., Rubio-Guillén, J., Bohórquez Corona, R. 2008. Morphometry characterization of boar sperm head with computer assisted analysis (preliminary results). *Revista Científica, FCV-LUZ* 18(5), 570-577. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-67449133501&partnerID=40&md5=73679a5732939fab0ce6b2a5051a3672>
73. Goszczynski, D., Molina, A., Terán, E., Morales-Durand, H., Ross, P., Cheng, H., . . . Demyda-Peyrás, S. 2018. Runs of homozygosity in a selected cattle population with extremely inbred bulls: Descriptive and functional analyses revealed highly variable patterns. *PLoS One*, 13(7). doi:10.1371/journal.pone.0200069
74. Gottschalk, M., Sieme, H., Martinsson, G., Distl, O. 2016. Heritability of semen traits in German Warmblood stallions. *Animal Reproduction Science*, 170, 10-14. doi:10.1016/j.anireprosci.2016.03.004
75. Griffin R.A., Baker M., Aitken R.J., A., S., Z., G. 2019. What makes a fertile sperm? Unique molecular attributes of stallion fertility. *Reproduction*, 158, R125–R137. doi:10.1530/rep
76. Gunnarsson, R., Staaf, J., Jansson, M., Ottesen, A. M., Goransson, H., Liljedahl, U., . . . Rosenquist, R. 2008. Screening for copy-number alterations and loss of heterozygosity in chronic lymphocytic leukemia--a comparative study of four differently designed, high resolution microarray platforms. *Genes Chromosomes Cancer*, 47(8), 697-711. doi:10.1002/gcc.20575
77. Gutierrez-Reinoso, M. A., Garcia-Herreros, M. 2016. Normozoospermic versus teratozoospermic domestic cats: differential testicular volume, sperm morphometry, and subpopulation structure during epididymal maturation. *Asian Journal of Andrology*, 18(6), 871-878. doi:10.4103/1008-682X.187583

78. Gutierrez, J. P., Goyache, F. 2005. A note on ENDOG: a computer program for analysing pedigree information. *J Anim Breed Genet*, 122(3), 172-176. doi:10.1111/j.1439-0388.2005.00512.x
79. Hadley, W., Romain, F., Lionel, H., K., M. 2020. dplyr: A Grammar of Data Manipulation.
80. Harton, G. L., Munne, S., Surrey, M., Grifo, J., Kaplan, B., McCulloh, D. H., . . . Group, P. G. D. P. 2013. Diminished effect of maternal age on implantation after preimplantation genetic diagnosis with array comparative genomic hybridization. *Fertil Steril*, 100(6), 1695-1703. doi:10.1016/j.fertnstert.2013.07.2002
81. Hill, E. W., McGivney, B. A., MacHugh, D. E. 2023. Inbreeding depression and durability in the North American Thoroughbred horse. *Animal Genetics*, 54(3), 408-411. doi:10.1111/age.13309
82. Holl, H. M., Lear, T. L., Nolen-Walston, R. D., Slack, J., Brooks, S. A. 2013. Detection of two equine trisomies using SNP-CGH. *Mammalian Genome*, 24(5-6), 252-256. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-84879552640&partnerID=40&md5=f63cd10988f6def43b892f826ca378d7>
83. Howrigan, D. P., Simonson, M. A., Keller, M. C. 2011. Detecting autozygosity through runs of homozygosity: a comparison of three autozygosity detection algorithms. *BMC Genomics*, 12(1), 460. doi:10.1186/1471-2164-12-460
84. Hughes, J. P., Rommershausen-Smith, A. T. 1977. Infertility in the horse associated with chromosomal abnormalities. *Australian Veterinary Journal*, 53(6), 253-257. doi:10.1111/j.1751-0813.1977.tb00208.x
85. Indahl, U. G., Naes, T., (2018), i. K. H. 2018. A similarity index for comparing coupled matrices. *Journal of Chemometrics*, 32. doi:ARTN e304910.1002/cem.3049
86. Jeffcott, L. B., Whitwell, K. E. 1973. Twinning as a cause of foetal and neonatal loss in the Thoroughbred mare. *Journal of Comparative Pathology*, 83(1), 91-106. doi:10.1016/0021-9975(73)90032-7
87. Juras, R., Raudsepp, T., Das, P. J., Conant, E., Cothran, E. G. 2010. XX/XY Blood Lymphocyte Chimerism in Heterosexual Dizygotic Twins from an American Bashkir Curly Horse. Case Report. *Journal of Equine Veterinary Science*, 30(10), 575-580. doi:10.1016/j.jevs.2010.09.001

88. Kalbfleisch, T. S., Rice, E. S., DePriest, M. S., Jr., Walenz, B. P., Hestand, M. S., Vermeesch, J. R., . . . MacLeod, J. N. 2018. Improved reference genome for the domestic horse increases assembly contiguity and composition. *Communications Biology*, 1, 197. doi:10.1038/s42003-018-0199-z
89. Kardos, M., Luikart, G., Allendorf, F. W. 2015. Measuring individual inbreeding in the age of genomics: marker-based measures are better than pedigrees. *Heredity (Edinb)*, 115(1), 63-72. doi:10.1038/hdy.2015.17
90. Kardos, M., Nietlisbach, P., Hedrick, P. W. 2018. How should we compare different genomic estimates of the strength of inbreeding depression? *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(11), E2492-E2493. doi:10.1073/pnas.1714475115
91. Kent, M. G., Shoffner, R. N., Hunter, A., Elliston, K. O., Schroder, W., Tolley, E., Wachtel, S. S. 1988. XY Sex reversal syndrome in the mare: Clinical and behavioral studies, H-Y phenotype. *Human Genetics*, 79(4), 321-328. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0023788476&partnerID=40&md5=725e836e7f1837976742210e1657ee56>
92. Khatib, H. 2015. *Molecular and quantitative animals genetics* (Vol. 59).
93. Kjöllström, H. J., Collares-Pereira, M. J., Oom, M. M. 2011. First evidence of sex chromosome mosaicism in the endangered Sorraia Horse breed. *Livestock Science*, 136(2-3), 273-276. doi:10.1016/j.livsci.2010.08.005
94. Klemetsdal, G., Johnson, M. 1988. Effect of Inbreeding on Fertility in Norwegian Trotter. *Livestock production science*, 21, 263-272.
95. Kruijer, W. 2019. heritability R Package.
96. Lacy, R. C. 1997. Importance of genetic variation to the viability of mammalian populations. *Journal of Mammalogy*, 78(2), 320-335. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0031543851&partnerID=40&md5=6a6aa52322d6a4a7d0567be8bfc42c61>
97. Laseca, N., Demyda-Peyras, S., Valera, M., Ramon, M., Escribano, B., Perdomo-Gonzalez, D. I., Molina, A. 2022. A genome-wide association study of mare fertility in the Pura Raza Espanol horse. *Animal*, 16(3), 100476. doi:10.1016/j.animal.2022.100476

98. Laseca, N., Molina, A., Ramon, M., Valera, M., Azcona, F., Encina, A., Demyda-Peyras, S. 2022. Fine-Scale Analysis of Runs of Homozygosity Islands Affecting Fertility in Mares. *Frontiers in Veterinary Science*, 9, 754028. doi:10.3389/fvets.2022.754028
99. Lawrence, M., Mastromonaco, G., Goodrowe, K., Santymire, R. M., Waddell, W., Schulte-Hostedde, A. I. 2017. The effects of inbreeding on sperm morphometry of captive-bred endangered mammals. *Canadian Journal of Zoology*, 95(8), 599-606. doi:10.1139/cjz-2016-0291
100. Lear, T. L., Bailey, E. 2008. Equine clinical cytogenetics: The past and future. *Cytogenetic and Genome Research*, 120(1-2), 42-49. doi:10.1159/000118739
101. Lear, T. L., Lundquist, J., Zent, W. W., Fishback Jr, W. D., Clark, A. 2008. Three autosomal chromosome translocations associated with repeated early embryonic loss (REEL) in the domestic horse (*Equus caballus*). *Cytogenetic and Genome Research*, 120(1-2), 117-122. doi:10.1159/000118749
102. Lear, T. L., McGee, R. B. 2012. Disorders of sexual development in the domestic horse, *Equus caballus*. *Sexual Development*, 6(1-3), 61-71. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-84857365943&partnerID=40&md5=608fe4213a976b0c53d11866e16dd312>
103. Lee, S. L., Maeng, G. H., Kim, N. H., Park, K. T., Lee, H. C., Lee, J. H. 2012. Disorder of sexual development in a Cocker spaniel dog: Sry-negative XX sex reversal. *Journal of Veterinary Clinics*, 29(5), 422-426. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-84874438200&partnerID=40&md5=bcc0d9a08184ce8d48ded6d3c381a188>
104. Leegwater, P. A., Vos-Loohuis, M., Ducro, B. J., Boegheim, I. J., van Steenbeek, F. G., Nijman, I. J., Schurink, A. 2016. Dwarfism with joint laxity in Friesian horses is associated with a splice site mutation in B4GALT7. *BMC Genomics*, 17(1), 839. doi:10.1186/s12864-016-3186-0
105. León, S., Moreno, D., Neira, J., Ramírez, G. 2007. Efecto de la asociación l-glutamina - etilenglicol en la criopres. *Revista de Medicina Veterinaria*, 14, 93-105.
106. Leroy, G. 2014. Inbreeding depression in livestock species: review and meta-analysis. *Animal Genetic*, 45(5), 618-628. doi:10.1111/age.12178

107. Levine, H., Jørgensen, N., Martino-Andrade, A., Mendiola, J., Weksler-Derri, D., Mindlis, I., Swan, S. H. 2017. Temporal trends in sperm count: A systematic review and meta-regression analysis. *Human Reproduction Update*, 23(6), 646-659. doi:10.1093/humupd/dmx022
108. Loomis, P. R., Squires, E. L. 2005. Frozen semen management in equine breeding programs. *Theriogenology*, 64(3), 480-491. doi:10.1016/j.theriogenology.2005.05.028
109. Lopes, F. B., Wu, X. L., Li, H., Xu, J., Perkins, T., Genho, J., . . . Rosa, G. J. M. 2018. Improving accuracy of genomic prediction in Brangus cattle by adding animals with imputed low-density SNP genotypes. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, 135(1), 14-27. doi:10.1111/jbg.12312
110. Losdat, S., Chang, S. M., Reid, J. M. 2014. Inbreeding depression in male gametic performance. *Journal of Evolutionary Biology*, 27(6), 992-1011. doi:10.1111/jeb.12403
111. Ludwig, A., Reissmann, M., Benecke, N., Bellone, R., Sandoval-Castellanos, E., Cieslak, M., Pruvost, M. 2015. Twenty-five thousand years of fluctuating selection on leopard complex spotting and congenital night blindness in horse. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 370(1660). doi:10.1098/rstb.2013.0386
112. Macfeely, R. A. 1990. Domestic Animal Cytogenetic. *Academic Press. Inc*, 34.
113. Madill, S. 2002. Reproductive considerations: mare and stallion. *Veterinary Clinics of North America - Equine Practice*, 18(3), 591-619. doi:10.1016/S0749-0739(02)00030-5
114. MAGyP. (2022a). Existencias equinas en la República Argentina. Retrieved from https://www.magyp.gob.ar/sitio/areas/equinos/informacion_estadistica/_archivos//00000000_Existencias/220623_Informe%20Existencias%20Equinas%202022.pdf
115. MAGyP. 2022b. *Exportaciones equinas de la Republica Argentina*. Retrieved from https://www.agroindustria.gob.ar/sitio/areas/equinos/informacion_estadistica/
116. MAPA. 2020. Programa de cria PRE. In. https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/zootecnia/razas-ganaderas/razas/catalogo-razas/equino-caballar/espanola/datos_morfologicos.aspx
117. MAPA. (2023). Raza equina caballar PURA RAZA ESPAÑOLA. Retrieved from https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/zootecnia/razas-ganaderas/razas/catalogo-razas/equino-caballar/espanola/datos_morfologicos.aspx

118. Markello, T. C., Carlson-Donohoe, H., Sincan, M., Adams, D., Bodine, D. M., Farrar, J. E., Gahl, W. A. 2012. Sensitive quantification of mosaicism using high density SNP arrays and the cumulative distribution function. *Mol Genet Metab*, 105(4), 665-671. doi:10.1016/j.ymgme.2011.12.015
119. Martí, J. I., Aparicio, I. M., García-Herreros, M. 2011. Head morphometric changes in cryopreserved ram spermatozoa are related to sexual maturity. *Theriogenology*, 75(3), 473-481. doi:10.1016/j.theriogenology.2010.09.015
120. Martínez-Pastor, F., García-Macias, V., Alvarez, M., Herraiez, P., Anel, L., De Paz, P. 2005. Sperm subpopulations in Iberian red deer epididymal sperm and their changes through the cryopreservation process. *Biology Reproduction*, 72(2), 316-327. doi:10.1095/biolreprod.104.032730
121. Martínez, M. M., Costa, M., Ratti, C. 2020. Molecular screening of XY SRY-negative sex reversal cases in horses revealed anomalies in amelogenin testing. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 32(6), 938-941. doi:10.1177/1040638720952380
122. Maximini, L., Fuerst-Waltl, B., Gredler, B., Baumung, R. 2011. Inbreeding depression on semen quality in Austrian dual-purpose simmental bulls. *Reproduction in Domestic Animals*, 46(1), e102-104. doi:10.1111/j.1439-0531.2010.01645.x
123. McCoy, A. M., Beeson, S. K., Rubin, C. J., Andersson, L., Caputo, P., Lykkjen, S., . . . McCue, M. E. 2019. Identification and validation of genetic variants predictive of gait in standardbred horses. *PLoS Genetics*, 15(5), e1008146. doi:10.1371/journal.pgen.1008146
124. McCue. 2014. Semen Freezing. *Equine Reproductive Procedures*, 436-440.
125. McCue, M. E., Bannasch, D. L., Petersen, J. L., Gurr, J., Bailey, E., Binns, M. M., . . . Mickelson, J. R. 2012. A high density SNP array for the domestic horse and extant *Perissodactyla*: Utility for association mapping, genetic diversity, and phylogeny studies. *PLoS Genetics*, 8(1). doi:10.1371/journal.pgen.1002451
126. McGivney, B. A., Han, H., Corduff, L. R., Katz, L. M., Tozaki, T., MacHugh, D. E., Hill, E. W. 2020. Genomic inbreeding trends, influential sire lines and selection in the global Thoroughbred horse population. *Scientific Reports*, 10(1), 466. doi:10.1038/s41598-019-57389-5

127. McQuillan, R., Leutenegger, A. L., Abdel-Rahman, R., Franklin, C. S., Pericic, M., Barac-Lauc, L., Wilson, J. F. 2008. Runs of homozygosity in European populations. *The American Journal of Human Genetics*, 83(3), 359-372. doi:10.1016/j.ajhg.2008.08.007
128. Moncaleano, J. S., Jimenez, L. M., Sanchez, C. A. 2007. Mosaicism leucocitary associated to infertility in four mares. *Revista ORINOQUIA*, 11.
129. Morley, S. A., Murray, J. A. 2014. Effects of Body Condition Score on the Reproductive Physiology of the Broodmare: A Review. *Journal of Equine Veterinary Science*, 34(7), 842-853. doi:10.1016/j.jevs.2014.04.001
130. Muller-Unterberg, M., Wallmann, S., Distl, O. 2017. Effects of inbreeding and other systematic effects on fertility of Black Forest Draught horses in Germany. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 59(1), 70. doi:10.1186/s13028-017-0338-4
131. Müller-Unterberg, M., Wallmann, S., Distl, O. 2017. Effects of inbreeding and other systematic effects on fertility of Black Forest Draught horses in Germany. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 59(1). doi:10.1186/s13028-017-0338-4
132. Muñoz, A., R., S., Rubio, M. D., Vivo, R., Aguera, E. I., Escribano, B. M., Castejon, F. M. 1997. Training as an Influential Factor on the locomotor Pattern in Andalusian Horses. *Journal of Veterinary Medicine Series A*.
133. Naranjo, S., Robledo, P. 2000. *CYTOGENETICS AND LIVESTOCK PRODUCTION USES*. <https://www.researchgate.net/publication/347513419>
134. Navarro, I. 2022. *Eficacia dos diluidores do kit sbscopysystem e do botucro na Criopreservacao de sémen em garanhões puro sangue lusitano*. UNIVERSIDADE DE LISBOA.
135. Neuhauser, S., Handler, J., Schelling, C., Pienkowska-Schelling, A. 2019. Fertility and 63,X Mosaicism in a Haflinger Sibship. *Journal of Equine Veterinary Science*, 78, 127-133. doi:10.1016/j.jevs.2019.05.008
136. Nikitkina, E., Musidray, A., Krutikova, A., Anipchenko, P., Plemyashov, K., Shiryaev, G. 2020. Efficiency of Tris-Based Extender Steridyl for Semen Cryopreservation in Stallions. *Animals (Basel)*, 10(10). doi:10.3390/ani10101801
137. Nolte, W., Alkhoder, H., Wobbe, M., Stock, K. F., Kalm, E., Vosgerau, S., . . . Kuhn, C. 2022. Replacement of microsatellite markers by imputed medium-density SNP arrays for

- parentage control in German warmblood horses. *Journal of Applied Genetics* 63(4), 783-792. doi:10.1007/s13353-022-00725-9
138. Ober, C., Hyslop, T., Hauck, W. W. 1999. Inbreeding effects on fertility in humans: evidence for reproductive compensation. *The American Journal of Human Genetics*, 64(1), 225-231. doi:10.1086/302198
139. Ocampo, D., Restrepo, G., Velásquez, A. 2013. EVALUACIÓN DE LA MOVILIDAD DEL SEMEN CRIOPRESERVADO DE CABALLOS CRIOLLO COLOMBIANO POR UN SISTEMA ANALIZADOR DE CLASE. *Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación científica*, 16(2), 445-450.
140. Oliveira, G. C., Oliveira, B. M. M., Celebhini, E. C. C., Fernández, C. B., Mattos, C. B. 2013. Criopreservación de semen equino: una revisión. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, 37, 23-28.
141. Ortega-Ferrusola, C., Macias Garcia, B., Suarez Rama, V., Gallardo-Bolanos, J. M., Gonzalez-Fernandez, L., Tapia, J. A., Pena, F. J. 2009. Identification of sperm subpopulations in stallion ejaculates: changes after cryopreservation and comparison with traditional statistics. *Reprod Domest Anim*, 44(3), 419-423. doi:10.1111/j.1439-0531.2008.01097.x
142. Ortega Ferrusola, C., Gonzalez Fernandez, L., Macias Garcia, B., Salazar-Sandoval, C., Morillo Rodriguez, A., Rodriguez Martinez, H., Pena, F. J. 2009. Effect of cryopreservation on nitric oxide production by stallion spermatozoa. *BIOLOGY OF REPRODUCTION*, 81(6), 1106-1111. doi:10.1095/biolreprod.109.078220
143. Ozaki, K., Ohnishi, Y., Iida, A., Sekine, A., Yamada, R., Tsunoda, T., . . . Tanaka, T. 2002. Functional SNPs in the lymphotoxin-alpha gene that are associated with susceptibility to myocardial infarction. *Nature Genetics*, 32(4), 650-654. doi:10.1038/ng1047
144. Padula, A. M. 2005. The freemartin syndrome: An update. *Animal Reproduction Science*, 87(1-2), 93-109. doi:10.1016/j.anireprosci.2004.09.008
145. Parlevliet, J., Kemp, B., Colenbrander, B. 1994. Reproductive characteristics and semen quality in maiden Dutch Warmblood stallions. *Reproduction*, 101, 183-187.
146. Paz, S., Aulicino, J. M., Pereyra, A. 2013. The competitiveness of the Argentinian thoroughbred stud farms through the identification of critical factors of success. *Archivos de Zootecnia*, 62(239), 333-344. doi:10.4321/S0004-05922013000300002

147. Perdomo-Gonzalez, D. I., Laseca, N., Demyda-Peyras, S., Valera, M., Cervantes, I., Molina, A. 2022. Fine-tuning genomic and pedigree inbreeding rates in equine population with a deep and reliable stud book: the case of the Pura Raza Espanola horse. *J Anim Sci Biotechnol*, 13(1), 127. doi:10.1186/s40104-022-00781-5
148. Perdomo-Gonzalez, D. I., Molina, A., Sanchez-Guerrero, M. J., Bartolome, E., Varona, L., Valera, M. 2021. Genetic inbreeding depression load for fertility traits in Pura Raza Espanola mares. *Journal of Animal Science*, 99(12). doi:10.1093/jas/skab316
149. Perdomo-Gonzalez, D. I., Sanchez-Guerrero, M. J., Molina, A., Valera, M. 2020. Genetic Structure Analysis of the Pura Raza Espanol Horse Population through Partial Inbreeding Coefficient Estimation. *Animals (Basel)*, 10(8). doi:10.3390/ani10081360
150. Peretti, V., Ciotola, F., Albarella, S., Paciello, O., Dario, C., Barbieri, V., Iannuzzi, L. 2008. XX/XY chimerism in cattle: Clinical and cytogenetic studies. *Sexual Development*, 2(1), 24-30. doi:10.1159/000117716
151. Pérez-Garnelo, S. S., Oter, M., Borque, C., Talavera, C., Delclaux, M., Martínez-Nevado, E., De la Fuente, J. 2006. Post-Thaw Viability Of European Bison (Bison Bonasus) Semen Frozen With Extenders Containing Egg Yolk or Lipids of Plant Origin and Examined With a Heterologous in Vitro Fertilization Assay. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 37(2), 116-125.
152. Peripolli, E., Munari, D. P., Silva, M., Lima, A. L. F., Irgang, R., Baldi, F. 2017. Runs of homozygosity: current knowledge and applications in livestock. *Animal Genetics*, 48(3), 255-271. doi:10.1111/age.12526
153. Pessanha Barreto, M. A., Straggiotti Silva, J. F., Fagundes, B., R., C. C., Valente de Souza, G., Shimoya, A. 2008. Efeito de proteínas do plasma seminal eqüino com massa superior a 10 kDa concentradas 10 vezes sobre a congelabilidade do sêmen. *Revista Brasileira de Zootecnia* 37(12), 2115-2119.
154. Petersen, J. L., Mickelson, J. R., Cothran, E. G., Andersson, L. S., Axelsson, J., Bailey, E., McCue, M. E. 2013. Genetic Diversity in the Modern Horse Illustrated from Genome-Wide SNP Data. *PLoS One*, 8(1). doi:10.1371/journal.pone.0054997
155. Pienkowska-Schelling, A., Kaul, A., Schelling, C. 2020. X chromosome aneuploidy and micronuclei in fertile mares. *Theriogenology*, 147, 34-38. doi:10.1016/j.theriogenology.2020.02.020

156. Pirosanto, Y., Laseca, N., Valera, M., Molina, A., Moreno-Millán, M., Bugno-Poniewierska, M., . . . Demyda-Peyrás, S. 2021. Screening and detection of chromosomal copy number alterations in the domestic horse using SNP-array genotyping data. *Animal Genetics*. doi:10.1111/age.13077
157. Polge, B. C. 1957. Low-temperature storage of mammalian spermatozoa. *Proceedings of the Royal Society of London*, 147, 498-508.
158. Popova, T., Manie, E., Stoppa-Lyonnet, D., Rigaille, G., Barillot, E., Stern, M. H. 2009. Genome Alteration Print (GAP): a tool to visualize and mine complex cancer genomic profiles obtained by SNP arrays. *Genome Biol*, 10(11), R128. doi:10.1186/gb-2009-10-11-r128
159. Power, M. M. 1990. Chromosomes of the horse. *Advances in veterinary science and comparative medicine*, 34, 131-167.
160. Power, M. M., Leadon, D. P. 1990. Diploid-triploid chimaerism (64, XX/96,XXY) in an intersex foal. *EQUINE VETERINARY JOURNAL*, 22(3), 211-214. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0025426292&partnerID=40&md5=e4c4d657b2981681f9130735688e4e60>
<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.2042-3306.1990.tb04250.x/abstract>
161. Poyato-Bonilla, J. 2021. *Genetic study of important traits in the Pura Raza Español horse breed. Implementation in the Breeding Program*. (Ph.D. Ph.D.). University of Seville, Seville, Spain. Retrieved from <https://bibliometria.us.es/prisma/publicacion/194210>
162. Poyato-Bonilla, J., Perdomo-Gonzalez, D. I., Sanchez-Guerrero, M. J., Varona, L., Molina, A., Casellas, J., Valera, M. 2020. Genetic inbreeding depression load for morphological traits and defects in the Pura Raza Espanola horse. *Genet Sel Evol*, 52(1), 62. doi:10.1186/s12711-020-00582-2
163. Pryce, J. E., Daetwyler, H. D. 2012. Designing dairy cattle breeding schemes under genomic selection: A review of international research. *Animal production science*, 52(2-3), 107-114. doi:10.1071/AN11098
164. Quintero-Moreno, A., Miró, J., Teresa Rigau, A., Rodríguez-Gil, J. E. 2003. Identification of sperm subpopulations with specific motility characteristics in stallion ejaculates. *Theriogenology*, 59(9), 1973-1990. doi:10.1016/s0093-691x(02)01297-9

165. R-Core-Team. 2023. R: A language and environment for statistical computing V4.2.3 "Shortstop Beagle.
166. Ramires Neto, C., Monteiro, G. A., Zanzarini Delfiol, D. J., Farras, M. C., Dell'aqua, J. A., Papa, F. O., Alvarenga, M. A. 2013. The relationships between scrotal surface temperature, age and sperm quality in stallions. *Livestock Science*, 157(1), 358-363. doi:10.1016/j.livsci.2013.06.026
167. Ramón, M., Jiménez-Rabadán, P., García-Álvarez, O., Maroto-Morales, A., Soler, A. J., Fernández-Santos, M. R., . . . Garde, J. J. 2014. Understanding sperm heterogeneity: Biological and practical implications. *Reproduction in Domestic Animals*, 49(s4), 30-36. doi:10.1111/rda.12404
168. Ramón, M., Martínez-Pastor, F. 2018. Implementation of novel statistical procedures and other advanced approaches to improve analysis of CASA data. *Reproduction, Fertility and Development*, 30(6), 860-866. doi:10.1071/RD17479
169. Raudsepp, T., Chowdhary, B. P. 2008. The horse pseudoautosomal region (PAR): characterization and comparison with the human, chimp and mouse PARs. *Cytogenet Genome Res*, 121(2), 102-109. doi:10.1159/000125835
170. Raudsepp, T., Chowdhary, B. P. 2016. Chromosome aberrations and fertility disorders in domestic animals. *Annual Review of Animal Biosciences*, 4, 15-43. doi:10.1146/annurev-animal-021815-111239
171. Raudsepp, T., McCue, M. E., Das, P. J., Dobson, L., Vishnoi, M., Fritz, K. L., . . . Chowdhary, B. P. 2012. Genome-Wide Association Study Implicates Testis-Sperm Specific FKBP6 as a Susceptibility Locus for Impaired Acrosome Reaction in Stallions. *PLoS Genetics*, 8(12). doi:10.1371/journal.pgen.1003139
172. Révay, T., Villagómez, D. A. F., Brewer, D., Chenier, T., King, W. A. 2012. GTG mutation in the start codon of the androgen receptor gene in a family of horses with 64,XY disorder of sex development. *Sexual Development*, 6(1-3), 108-116. doi:10.1159/000334049
173. Ricker, J. V., Linfor, J. J., Delfino, W. J., Kysar, P., Scholtz, E. L., Tablin, F., Meyers, S. A. 2006. Equine sperm membrane phase behavior: the effects of lipid-based cryoprotectants. *Biol Reprod*, 74(2), 359-365. doi:10.1095/biolreprod.105.046185

174. Robert, P., Escoufier, Y. 1976. A unifying tool for linear multivariate statistical methods: the RV-coefficient. *Journal of the Royal Statistical Society. Series C (Applied Statistics)*, 25, 257-265.
175. Rodriguez-Martin, C., Robledo, C., Gomez-Mariano, G., Monzon, S., Sastre, A., Abelairas, J., . . . Alonso, J. 2020. Frequency of low-level and high-level mosaicism in sporadic retinoblastoma: genotype-phenotype relationships. *Journal of Human Genetics*, 65(2), 165-174. doi:10.1038/s10038-019-0696-z
176. Sairanen, J., Nivola, K., Katila, T., Virtala, A. M., Ojala, M. 2009. Effects of inbreeding and other genetic components on equine fertility. *Animal*, 3(12), 1662-1672. doi:10.1017/S1751731109990553
177. Samper, J. C., Hankins, K. 2001. Breeding Mares with Frozen Semen in Private Practice. *AAEP PROCEEDINGS*, 47.
178. Sánchez-Guerrero, M. J., Molina, A., Gómez, M. D., Peña, F., Valera, M. 2016. Relationship between morphology and performance: Signature of mass-selection in Pura Raza Español horse. *Livestock Science*, 185, 148-155. doi:10.1016/j.livsci.2016.01.003
179. Sánchez, M. J., Gómez, M. D., 2014. Assessment Scores in Morphological Competitions of Pura Raza Español Horse. *INTERNATIONAL JOURNAL OF AGRICULTURE & BIOLOGY*, 16, 557–563. Retrieved from <http://www.fspublishers.org>
180. Sanchez, M. P., Tribout, T., Iannuccelli, N., Bouffaud, M., Servin, B., Tenghe, A., . . . Gilbert, H. 2014. A genome-wide association study of production traits in a commercial population of Large White pigs: Evidence of haplotypes affecting meat quality. *Genetics Selection Evolution*, 46(1). doi:10.1186/1297-9686-46-12
181. Schaefer, R. J., McCue, M. E. 2020. Equine genotyping arrays. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*, 36, 183-193.
182. Schaefer, R. J., McCue, M. E. 2020. Equine Genotyping Arrays. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*, 36(2), 183-193. doi:10.1016/j.cveq.2020.03.001
183. Schaefer, R. J., Schubert, M., Bailey, E., Bannasch, D. L., Barrey, E., Bar-Gal, G. K., McCue, M. E. 2017. Developing a 670k genotyping array to tag ~2M SNPs across 24 horse breeds. *BMC Genomics*, 18, 565. doi:10.1186/s12864-017-3943-8

184. Schmid, M., Bennewitz, J. 2017. Invited review: Genome-wide association analysis for quantitative traits in livestock - A selective review of statistical models and experimental designs. *Archives Animal Breeding*, 60(3), 335-346. doi:10.5194/aab-60-335-2017
185. Scoggin, C. F. 2015. Not just a number: Effect of age on fertility, pregnancy and offspring vigour in thoroughbred brood-mares. *Reproduction, Fertility and Development*, 27(6), 872-879. doi:10.1071/RD14390
186. Sharmaa, A., Lee, J. S., Dang, C. G., Sudrajad, P., Kim, H. C., Yeon, S. H., Lee, S. H. 2015. Stories and challenges of genome wide association studies in livestock - a review. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 28(10), 1371-1379. doi:10.5713/ajas.14.0715
187. Shilton, C. A., Kahler, A., Davis, B. W., Crabtree, J. R., Crowhurst, J., McGladdery, A. J., . . . de Mestre, A. M. 2020. Whole genome analysis reveals aneuploidies in early pregnancy loss in the horse. *Scientific Reports*, 10(1), 13314. doi:10.1038/s41598-020-69967-z
188. Shimmin, L. C., Chang, B. H.-J., Hewett-Emmett, D., Li, W.-H. 1993. Potential problems in estimating the male to-female mutation rate ratio from DNA sequence data. *Journal of molecular evolution*, 37, 160-166.
189. Singh, R. R., Mehrotra, M., Chen, H., Almohammedsalim, A. A., Sahin, A., Bosamra, A., . . . Luthra, R. 2016. Comprehensive Screening of Gene Copy Number Aberrations in Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded Solid Tumors Using Molecular Inversion Probe-Based Single-Nucleotide Polymorphism Array. *The Journal of Molecular Diagnostics*, 18(5), 676-687. doi:10.1016/j.jmoldx.2016.03.008
190. Squires, E. L. 2009. Changes in Equine Reproduction: Have They Been Good or Bad for the Horse Industry? *Journal of Equine Veterinary Science*, 29(5), 268-273. doi:10.1016/j.jevs.2009.04.184
191. StatSoft, I. 2011. STATISTICA. Version 10. . www.statsoft.com.
192. Sugimoto, M., Gotoh, Y., Kawahara, T., Sugimoto, Y. 2015. Molecular effects of polymorphism in the 3'UTR of unc-5 homolog C associated with conception rate in Holsteins. *PLoS One*, 10(7). doi:10.1371/journal.pone.0131283
193. Szczerbal, I., Nowacka-Woszek, J., Kopp-Kuhlman, C., Mackowski, M., Switonski, M. 2020. Application of droplet digital PCR in diagnosing of X monosomy in mares. *Equine Veterinary Journal*, 52(4), 627-631. doi:10.1111/evj.13214

194. Tang, Y. C., Amon, A. 2013. Gene copy-number alterations: a cost-benefit analysis. *Cell*, 152(3), 394-405. doi:10.1016/j.cell.2012.11.043
195. Team, R. C. 2020. R: A Language and Environment for Statistical Computing v4.0.3 "Bunny-Wunnies Freak Out".
196. Teran, E., Azcona, F., Ramon, M., Molina, A., Dorado, J., Hidalgo, M., . . . Demyda-Peyras, S. 2021. Sperm morphometry is affected by increased inbreeding in the Retinta cattle breed: A molecular approach. *Molecular Reproduction Development*, 88(6), 416-426. doi:10.1002/mrd.23475
197. ThermoFisher. (2013). Axiom CNV Summary Tool. Retrieved from https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/axiom_cnv_summary_tool_usermanual.pdf
198. ThermoFisher. (2019). Axiom copy number analysis.
199. Thurston, L. M., Holt, W. V., Watson, P. F. 2003. Post-thaw functional status of boar spermatozoa cryopreserved using three controlled rate freezers: a comparison. *Theriogenology*, 60(1), 101-113. doi:10.1016/S0093-691X(02)01331-6
200. Todd, E. T., Hamilton, N. A., Velie, B. D., Thomson, P. C. 2020. The effects of inbreeding on covering success, gestation length and foal sex ratio in Australian thoroughbred horses. *BMC Genetics*, 21(1), 41. doi:10.1186/s12863-020-00847-1
201. Valera, M., Molina, A., Gutiérrez, J. P., Gómez, J., Goyache, F. 2005. Pedigree analysis in the Andalusian horse: Population structure, genetic variability and influence of the Carthusian strain. *Livestock production science*, 95(1-2), 57-66. doi:10.1016/j.livprodsci.2004.12.004
202. Valverde, A., Arenan, H., Sancho, M., Contell, J., Yaniz, J., Fernandez, A., Soler, C. 2016. Morphometry and subpopulation structure of Holstein bull spermatozoa: variations in ejaculates and cryopreservation straws. *Asian Journal of Andrology*, 18(6), 851-857. doi:10.4103/1008-682X.187579
203. Van Eldik, P., Van der Waaij, E. H., Ducro, B., Kooper, A. W., Stout, T. A., Colenbrander, B. 2006. Possible negative effects of inbreeding on semen quality in Shetland pony stallions. *Theriogenology*, 65(6), 1159-1170. doi:10.1016/j.theriogenology.2005.08.001

204. Vandeplassche, M., Podliachouk, L., Beaud, R. 1970. Some aspects of twin-gestation in the mare. *Canadian Journal of Comparative Medicine*, 34(3), 218-226. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1319496/pdf/compmed00063-0056.pdf>
205. Vattathil, S., Scheet, P. 2013. Haplotype-based profiling of subtle allelic imbalance with SNP arrays. *Genome Res*, 23(1), 152-158. doi:10.1101/gr.141374.112
206. Verlouw, J. A. M., Clemens, E., de Vries, J. H., Zolk, O., Verkerk, A., Am Zehnhoff-Dinnesen, A., . . . Broer, L. 2021. A comparison of genotyping arrays. *European Journal of Human Genetics*, 29(11), 1611-1624. doi:10.1038/s41431-021-00917-7
207. Villagómez, D. A. F., Lear, T. L., Chenier, T., Lee, S., McGee, R. B., Cahill, J., . . . King, W. A. 2011. Equine disorders of sexual development in 17 mares including XX, SRY-negative, XY, SRY-negative and XY, SRY-positive genotypes. *Sexual Development*, 5(1), 16-25. doi:10.1159/000322811
208. Villagómez, D. A. F., Parma, P., Radi, O., Di Meo, G., Pinton, A., Iannuzzi, L., King, W. A. 2009. Classical and molecular cytogenetics of disorders of sex development in domestic animals. *Cytogenetic and Genome Research*, 126(1-2), 110-131. doi:10.1159/000245911
209. Villagómez, D. A. F., Pinton, A. 2008. Chromosomal abnormalities, meiotic behavior and fertility in domestic animals. *Cytogenetic and Genome Research*, 120(1-2), 69-80. doi:10.1159/000118742
210. Visscher, P. M., Brown, M. A., McCarthy, M. I., Yang, J. 2012. Five years of GWAS discovery. *American Journal of Human Genetics*, 90(1), 7-24. doi:10.1016/j.ajhg.2011.11.029
211. Watson, P. F. 2000. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal Reproduction Science*, 60-61, 481-492.
212. Weitkamp, L. R., MacCluer, J. W., Guttormsen, S., McKnight, J., Wert, N., Witmer, J., . . . Egloff, J. 1982. Genetics of Standardbred stallion reproductive performance. *Journal of reproduction and fertility. Supplement*, 32, 135-142. Retrieved from <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-0020348073&partnerID=40&md5=5341c5a2b9e58ac9131ca0f4758a1d37>
213. Whitesell, K., Stefanovski, D., McDonnell, S., Turner, R. 2020. Evaluation of the effect of laboratory methods on semen analysis and breeding soundness examination (BSE)

- classification in stallions. *Theriogenology*, 142, 67-76.
doi:10.1016/j.theriogenology.2019.09.035
214. Wickham, H. 2016. *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*. Springer International Publishing.
215. Wiggans, G. R., Cole, J. B., Hubbard, S. M., Sonstegard, T. S. 2017. Genomic Selection in Dairy Cattle: The USDA Experience. *Annual Review of Animal Biosciences*, 5(1), 309-327. doi:10.1146/annurev-animal-021815-111422
216. Wilson, M., Williams, J., Montrose, V. T., Williams, J. 2019. Variance in Stallion Semen Quality among Equestrian Sporting Disciplines and Competition Levels. *Animals (Basel)*, 9(8). doi:10.3390/ani9080485
217. Wolc, A., Arango, J., Jankowski, T., Dunn, I., Settar, P., Fulton, J. E., . . . Dekkers, J. C. M. 2014. Genome-wide association study for egg production and quality in layer chickens. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, 131(3), 173-182. doi:10.1111/jbg.12086
218. Wolc, A., Torzynski, G., Szwaczkowski, T. 2009. Genetic effects on reproductive traits in Warmblood horses. *Canadian Journal of Animal Science*, 89(2), 215-218. doi:10.4141/CJAS08067
219. Wright, S. 1931. Evolution in Mendelian Populations. *Genetics*, 16(2), 97-159. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17246615>
220. Zanella, R. 2016. Genomic tools and animal health. *Veterinary Sciences*, 3(3). doi:10.3390/vetsci3030021