



DEPARTAMENTO DE GENÉTICA
DEPARTAMENTO DE PRODUCCIÓN ANIMAL
UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

ANÁLISIS DEMOGRÁFICO Y CARACTERIZACIÓN SEMINAL DEL CABALLO DE LAS RETUERTAS DE DOÑANA

PRESENTADO POR

MARÍA MIRÓ ARIAS

Para optar al grado de Doctor por la Universidad de Córdoba

Córdoba, 2015

TITULO: *Análisis demográfico y caracterización seminal del caballo de las retuertas de doñana*

AUTOR: *María Miro Arias*

© Edita: Servicio de Publicaciones de la Universidad de Córdoba. 2016
Campus de Rabanales
Ctra. Nacional IV, Km. 396 A
14071 Córdoba

www.uco.es/publicaciones
publicaciones@uco.es

Dr. Jose Luis Vega Pla, Director del Laboratorio de Investigación Aplicada, Subdirección General de la administración Periférica, Ministerio de Defensa.

Dr. Jose Manuel León Jurado, Investigador del Departamento de Genética de la Universidad de Córdoba.

INFORMAN

Que la tesis doctoral titulada ANÁLISIS DEMOGRÁFICO Y CARACTERIZACIÓN SEMINAL DEL CABALLO DE LAS RETUERTAS DE DOÑANA, realizada por Dña. María Miró Arias bajo nuestra dirección y asesoramiento, reúne las condiciones y calidad científica deseadas para la defensa por parte del doctorando con vistas a optar por el grado de doctor.

Para que conste y a los efectos oportunos firmamos la presente en Córdoba (España), a 17 de noviembre de 2015.

Firma de los directores

Fdo.: Jose Luis Vega Pla

Fdo.: Jose Manuel León Jurado

DEDICATORIA

*A mis padres, por ser mi origen y mi camino;
A mi hermana Trinidad, mi ejemplo a seguir*

*A Rafa, mi compañero de viaje,
Por hacer grande cada momento insignificante
Y llenarlo de felicidad*

Esta tesis es por ellos y para ellos

*Trabajé mi suerte con delirio día a día,
Tropecé mil veces y aprendí a volar.
(Raphael)*

AGRADECIMIENTOS

A Ángel Vallecillo, por ser mi hermano, amigo y maestro.

A Jose Luis, por ser el mejor director que se pueda encontrar; Por su disciplina y su eterna paciencia; Por sus consejos y sus palabras de apoyo cuando más lo necesitaba; Por haber volcado toda su experiencia y profesionalidad.

A Juanvi, por brindarme esa primera oportunidad de trabajar a su lado hace ya diez años; Por compartir su experiencia, vivencias, risas y buenos ratos, por compartir hasta su despacho; por confiar en mi tanto o más que yo misma.

A Espe, por su energía positiva y por ser una mujer de bandera, un ejemplo a seguir.

A Águeda, Javi, Ander y Sergio, mis compañeros de batalla; Por estar siempre disponibles y dispuestos a colaborar. Esta es tan solo la primera de las cuatro tesis doctorales que vamos a sacar adelante.

A todos los estudiantes, compañeros y amigos que han pasado por la sala de becarios y que han dejado mucho de ellos en mí. En especial a María Cruz, Judith, Montse, Saif y Abdoallah.

A mis compañeros del Centro Agropecuario de la Diputación de Córdoba. En especial a Jose, Kiki, Alejandro, Paco, Nene... Por todo su apoyo logístico y personal. Por los buenos momentos que hemos pasado y los que quedan por llegar.

Al equipo del Laboratorio de Investigación Aplicada del Ministerio de Defensa. A Rafa, Paco, Jose Manuel, Manolo, Pedro, M^a Carmen, Tino, Rafael, Santiago, Almudena, Lourdes y Meli, por tantas risas y horas y horas al lado de esos caballos. Por un trabajo bien hecho.

A Fernando Peña, Cristiga Ortega y todo su equipo del Hospital Clínico Veterinario de la Universidad de Extremadura, por su calidad científica y humana.

A Nuno, Inés y demás compañeros del INIAV (Santarem, Portugal), por acogerme en su institución y en su casa.

A Juan Galisteo, Juanma López y toda la familia de Las Turquillas y del Centro de Cría y Remonta del Ministerio de Defensa (Écija); A Carlos Marín, esos maestros que me inculcaron la pasión por esta profesión. Aquellas primeras ecografías y visitas a explotaciones me marcaron tanto que fueron el motivo de mi especialización en reproducción animal.

A Coco y Ana, mis mejores amigas; por esos cafés terapéuticos que regeneran cuerpo y mente

1 Contenido

1. INTRODUCCION.....	11
1.1 ESTADO DEL PROBLEMA.....	11
1.2 OBJETIVOS.....	13
1.2.1 Objetivo general.....	13
1.2.2 Objetivos específicos	13
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	15
2.4.1 Polimorfismos bioquímicos	28
2.4.2 Marcadores microsatélites	28
2.4.3 Estructura y distancias entre poblaciones	32
2.5.1 Endogamia y tamaño efectivo.....	44
2.5.2 Deriva genética.....	46
2.5.3 Depresión exogámica	46
2.5.4 Fragmentación de la población	46
2.5.5 Coeficiente de relación promedio (AR).....	46
2.5.6 Nivel de reconstrucción del pedigrí	47
2.5.7 Selección de los ancestros	47
2.5.8 Índice de conservación genética (GCI).....	48
2.5.9 Intervalos generacionales	48
3. METODOLOGIA Y DISEÑO EXPERIMENTAL.....	59
3.1 METODOLOGIA Y DISEÑO EXPERIMENTAL DEL ANÁLISIS DEMOGRÁFICO	59
3.1.1 Descripción de la población.....	59
3.1.2 Recogida de las muestras.....	61
3.1.3 Tipificación de las muestra	61
3.1.4 Análisis poblacional	62
3.2 METODOLOGÍA Y DISEÑO EXPERIMENTAL DE LA CARACTERIZACIÓN SEMINAL	63
3.2.1 Animales	63
3.2.2 Localización y periodo del experimento	65
3.2.3 Adaptación	65
3.2.4 Adiestramiento	65
3.2.5 Recolección de semen	65
3.2.6 Análisis del semen	66
3.2.7 Análisis unifactorial de efectos fijos y prueba a posteriori de homogeneidad de medias para las características seminales de Caballos de la Retuerta.....	67
3.2.8 Criopreservación seminal con diversos diluyentes	68
3.2.9 Estimación de la calidad del semen mediante sistema CASA	70
3.2.10 Evaluación de la vitalidad espermática y grado de apoptosis en el semen criopreservado mediante citometría de flujo.....	71
4. RESULTADOS.....	73
4.1 RESULTADOS DEL ANÁLISIS DEMOGRÁFICO	73
4.2 RESULTADOS DE LA CARACTERIZACIÓN SEMINAL	81

4.2.1	Estadísticos descriptivos y dispersión de las variables seminales para el conjunto de sementales.....	81
4.2.2	Análisis unifactorial simple del factor seminal sobre las variables seminales estudiadas	83
4.2.3	Separación de medias a posteriori para la Motilidad Masal y separación de medias a posteriori para la Motilidad Progresiva.....	85
4.2.4	Estimación objetiva del estado de conservación del banco de germoplasma mediante citómetro de flujo	86
4.2.5	Estimación objetiva del estado de conservación del banco de germoplasma mediante sistema CASA	86
4.2.6	Estimación del grado de susceptibilidad a la peroxidación lipídica	100
4.2.7	Criopreservación seminal.....	104
5.	DISCUSIÓN.....	105
5.1	DISCUSIÓN DEL ANÁLISIS DEMOGRÁFICO	105
5.2	DISCUSIÓN DE LA CARACTERIZACIÓN SEMINAL	107
6.	CONCLUSIONES.....	111
7.	ANEXO I.....	112
7.1.	PLANTEAMIENTO DE UN PLAN DE CONSERVACIÓN <i>IN VIVO IN SITU</i>	112
7.2.	PLANTEAMIENTO DE UN PLAN DE CONSERVACIÓN <i>IN VIVO EX SITU</i>	112
8.	PUBLICACIONES RELACIONADAS CON ESTE ESTUDIO.....	114
9.	PRESENTACIONES EN CONGRESOS.....	115
10.	NOTAS DE PRENSA.....	116
11.	BIBLIOGRAFÍA.....	117

RESUMEN

El Caballo de las Retuertas de Doñana consta de una población de unos 150 ejemplares ubicados en los espacios protegidos de la Reserva Biológica de Doñana, donde deambulan libremente. Al tipificar el caballo de las Retuertas con marcadores bioquímicos se observa un alelo nuevo de Carboxilesterasa en un grupo de individuos de la población. Este alelo se coteja con la información disponible en otros laboratorios de Genética Equina del mundo, y se deduce podría ser único de esta raza. Este hallazgo da pie a continuar con un protocolo de caracterización de la raza, para conocerla en profundidad y justificar su reconocimiento como raza autóctona española de protección especial por parte del Ministerio de Agricultura, previo estudio y aprobación del Comité de Razas de Ganado de España. El objetivo de ese trabajo es realizar un estudio de la situación genética actual del caballo de las Retuertas y desarrollar la metodología necesaria para la implantación de un programa de conservación completo basado en métodos *in situ* y *ex situ*. Para el estudio genético, se tipifican las muestras de sangre tomadas de toda la población y se realiza una caracterización genética basada en microsatélites. Esta información genética, junto con la obtenida tras la realización de un profundo estudio demográfico, da como resultado la reconstrucción del árbol genealógico de la raza. Con esta información (ej. Consanguinidad, índice de Conservación Genética, etc.) Se pueden seleccionar reproductores. Para la caracterización reproductiva se recogen muestras seminales de cuatro sementales de la raza, dando como resultado unas características comparables a las de otras razas autóctonas, esto ha permitido la creación de un banco de germoplasma que garantice la supervivencia de la población.

ABSTRACT

The Retuertas horse from Doñana has a population of around 150 individuals located within the protected areas of the Doñana Biological Reserve, in which they freely roam. When categorizing Retuertas horse with biochemical markers, a new Carboxylesterase allele can be observed in a group of individuals in the population. This allele is compared and contrasted with other equine genetics laboratories' available information in the world and it can be deduced to be unique to this breed. This finding leads to continue a characterization protocol for the breed, in order to know it thoroughly and to justify its recognition as a special protection Spanish breed by the Ministry of Agriculture, with the previous study and approval from the Livestock Breeds Committee of Spain. The aim of this project is to study the Retuertas horse current genetic situation and to develop the methodology for the implementation of a comprehensive conservation program based on *in situ* and *ex situ* methods. For the genetic study, blood samples of the entire population are classified and a genetic characterization based on microsatellites is performed. This genetic information, all together with the one obtained after conducting a thorough demographic study results in the reconstruction of the breed's family tree. With this information (i.e.; Inbreeding, Genetic Conservation index, etc.) breeding individuals can be selected. For its seminal characterization, samples from four stallions from the breed are collected, with comparable resulting characteristics to those from other native breeds; this has allowed the creation of a germplasm bank to ensure the population's survival.

1. INTRODUCCION

1.1 ESTADO DEL PROBLEMA

La Estación Biológica de Doñana, Instituto de Investigación perteneciente al Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), mantiene, en una finca de 10.000 ha que posee en el interior del Parque Nacional (la Reserva Biológica de Doñana), una pequeña población equina de 186 ejemplares denominada "Caballo de las Retuertas"(Imagen 1). Este animal es muy distinto del Pura Raza Española e incluso de otras razas *a priori* más próximas desde el punto de vista geográfico, como el Caballo Marismeño.



Imagen 1. Caballos de las Retuertas de Doñana desenvolviéndose en su medio

En el año 2000, se establece un contacto entre los investigadores de la Estación Biológica de Doñana liderados por el Dr. Juan Calderón y el grupo de investigación PAIDI AGR-218 de la Universidad de Córdoba “Mejora y conservación de los recursos genéticos de los animales domésticos”, en este caso liderados por el Dr. Juan Vicente Delgado, con la intención de estudiar conjuntamente el ganado vacuno de Doñana, perteneciente a la raza bovina Marismeña.

En aquel contacto, el Dr. Calderón comenta la presencia, en los espacios protegidos de la Reserva Biológica de Doñana, de una población equina diferenciada morfológicamente que deambula libremente en total asilvestramiento desde siempre. En la zona se conocen a estos caballos como “de las retuertas”, debido a que su carácter hosco sólo permite su observación directa en las lagunas de agua dulce del área y, entre ellas, las que se forman en verano en algunas zonas en el límite de las arenas del monte y la arcilla de la marisma, conocidas como “retuertas”, donde se acercan a beber en esta estación.

De esta manera, se incorporan al proyecto como especialistas en genética equina, los técnicos del Laboratorio de Genética Molecular (actualmente Laboratorio de Investigación Aplicada) del Servicio de Cría Caballar, organismo autónomo del Ministerio de Defensa. En el Laboratorio se dispone en su laboratorio de información de decenas de miles de caballos pertenecientes a la mayoría de las razas nacionales y extranjeras explotadas en España y tipificadas con alguno o todos de los tres tipos de marcadores que se han estado usando sistemáticamente para la caracterización equina:

- Marcadores inmunogenéticos (como los grupos sanguíneos)
- Polimorfismos bioquímicos del suero
- Enzimas sanguíneas y marcadores moleculares (específicamente, los microsatélites)

Al tipificar el caballo de las Retuertas con marcadores bioquímicos se observa, como se describe más adelante, un alelo nuevo de Caboxilesterasa en un grupo de individuos de la población. Se coteja con la información disponible en con otros laboratorios de Genética Equina del mundo, y se deduce podría ser único de esta raza.

Este descubrimiento, a pesar de no ofrecer más allá que una curiosidad de la raza (ya que solo permite decir que cualquier animal que presente este alelo pertenece a la raza, pero no que un animal que no lo presente no pertenezca), sí que resulta una motivación para investigaciones más profundas en estos caballos, y evita, al menos temporalmente, su erradicación de la Reserva Biológica de Doñana.

En ese momento, se establece un equipo multidisciplinar (Genetistas, Zooetnólogos, Evolucionistas, Ecólogos, Historiadores, especialistas en reproducción asistida) y multi-institucional (Universidad de Córdoba, Universidad Complutense de Madrid, Estación Biológica de Doñana-CSIC, Diputación de Córdoba, IFAPA y Ministerio de Defensa), con el fin de seguir un protocolo de caracterización de la raza. Esto permite conocerla en profundidad y justificar su reconocimiento como raza autóctona española de protección especial por parte del Ministerio de Agricultura, previo estudio y aprobación del Comité de Razas de Ganado de España. También se reconoce la trascendencia de diseñar estrategias de conservación *in situ* y *ex situ* de la población. Con estos antecedentes se plantea realizar un estudio demográfico de la población y abordar la creación de un banco de germoplasma.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 *Objetivo general*

Estudio de la situación genética actual del caballo de las Retuertas y desarrollo de la metodología necesaria para el seguimiento genealógico como base para la implantación de un programa de conservación completo basado en métodos *in situ* y *ex situ*.

1.2.2 *Objetivos específicos*

1. *Reconstrucción del árbol genético de la raza combinando estudios genéticos y demográficos. Se trata de un estudio para confirmar las genealogías y relaciones de parentesco a partir de pruebas de caracterización genética con marcadores moleculares.*
2. *Descripción de la estructura y la dinámica poblacional del caballo de las Retuertas.*
3. *Caracterización reproductiva del semental de Las Retuertas y creación de un banco de germoplasma como parte de un plan de conservación ex situ.*

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 ANTECEDENTES HISTÓRICOS Y SITUACIÓN ACTUAL

Para comenzar el tratado histórico de los antecedentes del caballo de las Retuertas de Doñana, es preciso recalcar que, tras la publicación de los descubrimientos genéticos sobre esta raza en revistas científicas internacionales de impacto, así como más recientemente en la prensa general, son muchos los interesados en conocer más profundamente esta raza. Algunos investigadores han mostrado interés en realizar trabajos en colaboración tratando de establecer paralelismos genéticos entre el ADN fósil de equinos salvajes recuperados de los yacimientos de Atapuerca y el actual caballo de las Retuertas.

Frecuentemente, se suele cometer el error de tratar los aspectos históricos de las razas domésticas actuales de acuerdo a los criterios zootécnicos actuales, sin observar que las razas autóctonas, en la mayor parte de su pasado, no estuvieron en un contexto tecnológico como el actual. La relación entre humanos y equinos en la península ibérica se remonta a la prehistoria y se enmarca en el binomio cazador-presa.

Los équidos desaparecieron del continente americano hace unos ocho mil años siendo reintroducidos por los españoles en el siglo X, formándose una gran amalgama de razas criollas de gran valor zootécnico actual.

En etapas postglaciares, los grupos sobrevivientes comenzaron a extenderse desde Asia hasta Europa y África siendo los antecesores del caballo actual, conocido como *Equus caballus*.

Su evolución reciente corresponde principalmente a cuatro tipos básicos, de los cuales descienden las razas existentes:

- El caballo del bosque de tipo sólido, con cabeza y cascos grandes, es muy posible que fuera el fundador de los caballos de sangre fría y razas de tiro.
- El caballo de la meseta, de tipo más fino; de él descienden los pequeños y resistentes caballos mongoles semisalvajes.
- El caballo de la estepa, de un tipo más ligero, originó las razas orientales, como el árabe.
- El caballo de la tundra de tipo grande y pesado, como el Yakut proveniente de las regiones polares.

Existen evidencias de que el caballo fue domesticado hace cinco o seis mil años, los primeros en intentar la domesticación del caballo fueron las tribus nómadas, a medida que viajaban a través de las regiones de los mares Caspio y Negro. La domesticación de caballo como actividad se data, por tanto, en unas épocas mucho más recientes a las de los pequeños rumiantes.

En la península Ibérica, es preciso hablar por un lado de la introducción del caballo, y por otro de la introducción de las prácticas domesticadoras. Actualmente, existe una base evolutiva de dos tipos:

- En el Noroeste, se encuentran múltiples razas de tipo Celta, entendiéndose por tales a los animales que muestran similitudes con otros grupos tradicionales del Centro y el Norte de Europa.
- En el área Meridional, existen unos recursos que pueden ser considerado propiamente Ibéricos: Sus principales representantes son, sin duda, el caballo Pura Raza Español y el caballo Lusitano, pero al que también pertenecen otras razas como el Marismeno, el Sorraia y el propio Retuertas de Doñana.

Es necesario recordar que, en aquella época, no existía el concepto de raza y que los animales se hibridaban continuamente fruto de las conquistas y los movimientos de las civilizaciones; por tanto, todas las razas conocidas son fruto de la dinámica genética establecidas por la producción animal en las distintas épocas.

De hecho, las razas Sorraia y Retuertas de Doñana, probablemente sean, de las mencionadas, las que presentan un menor interés comercial debido a su aislamiento y abandono a través de los siglos. Sin embargo, poseen el mayor interés biológico, ya que mantienen la relación más cerrada con las poblaciones históricas, debido a que han mantenido, en buena parte de su evolución reciente, una sistemática cría asilvestrada; es decir, no sometida a la intervención del hombre.

Centrándonos en la explotación equina, en el área de distribución actual del caballo de las Retuertas de Doñana, es necesario hacer referencia al libro de Muñoz Bort (2004), en el que se realiza una presentación histórica impecable de la producción equina en el suroeste español en periodos históricos, expresada como justificación de la práctica ancestral de la “Saca de las Yeguas” en la Villa de Almonte.

En las páginas iniciales, Muñoz hace referencia a la importancia de los équidos Ibéricos en las épocas Romana y Visigoda, resaltando el papel de los animales procedentes de la Bética y Lusitania en las carreras de carros. Este autor corrobora la decadencia temporal de estos équidos meridionales tras las invasiones nórdicas de la península, probablemente, debida a la importancia que atesoraron los caballos bélicos introducidos por los pueblos nórdicos.

En el periodo musulmán, la relevancia de los recursos genéticos Ibéricos localizados en áreas meridionales de la península se recuperaron, especializándose los grandes latifundios ubicados en las Marismas del Río Guadalquivir en la producción de potros que eran seleccionados y comercializados hacia las áreas de mayor poder económico y político en Córdoba y Granada.

Probablemente, en estas fechas, se estarían formando esbozos de lo que hoy se conocen como razas, que en aquel momento se entendía como especializaciones animales para hacer frente a la demanda comercial. Es decir, ya se podrían estar formando unos caballos de élite que podrían ser la base de los actuales Pura Raza Española y Lusitano, mientras que en manos del pueblo llano, se mantendrían animales del mismo tronco pero más especializados en el trabajo y de peor calidad estética.

Tras La Reconquista, la producción equina en la Marisma sufrió una profunda reorganización, con no pocos conflictos por la utilización de los pastos; si bien, en esta época, se alcanzaría el reconocimiento Real de los caballos andaluces, dotándolos de una protección especial.

Sin duda, en estas épocas, la evolución zootécnica ya había provocado alguna diferenciación entre los caballos Ibéricos (meridionales) de valía comercial y los animales destinados al trabajo.

Esto quedó evidente por un suceso que aconteció en el primer viaje de Colón a las Indias en 1492 (Rodero *et al.* 1992): Al parecer, el Almirante adquirió diez yeguas y diez caballos enteros para portarlos a las Indias, con intenciones defensivas. Estos animales fueron exhibidos en Sevilla con gran alarde, pero, cuando el Almirante observó los animales que se habían cargado, escribió su gran decepción ya que en la estiba habían sido sustituidos por unos “pencos matalones” locales. Probablemente, estos pencos serían caballos Ibéricos rurales, próximos a los antecesores del Caballo de las Retuertas de Doñana.

Estos caballos intervinieron en la formación de las razas criollas latinoamericanas actuales, pero junto con animales más selectos enviados con posterioridad. En las razas asilvestradas americanas y en las razas en manos de indios y campesinos siguen existiendo animales de mucha proximidad morfológica con el caballo de las Retuertas de Doñana, las cuales se están estudiando con marcadores genéticos en la actualidad, existiendo ya algunos avances publicados (Vega-Pla *et al.* 2006).

Rodero *et al.* (1992) ya apuntan en su trabajo cómo en el siglo XV sólo un reducido número de poblaciones animales mantenían una clara diferenciación, entre ellas destacaban el Cerdo Ibérico, la cabra Granadina, el ovino Merino y el caballo Español (Andaluz). Sobre el resto de poblaciones españolas no existían referencias o cuando aparecían eran imprecisas desde el punto de vista de la descripción racial.

Por todo esto, se pueden localizar los antecedentes del caballo de las Retuertas de Doñana en los caballos de trabajo que se utilizaban en la Marisma para las labores del campo especialmente en áreas encharcadas. Por tanto, formando parte del mismo tronco, el caballo Español ya se había diferenciado en el siglo XV como una población bien definida, con unas directrices de cría claras, al estar en manos de clases pudientes y militares; mientras que el caballo de la Marisma no se había definido.

Es evidente que poco se parece el caballo Español actual con aquel animal del siglo XV. Sin embargo, un caballo como el de las Retuertas de Doñana, sometido a un manejo genético mucho menos exigente, sí mantendría, probablemente, un parecido más directo con el de aquella época.

En los siglos XVI y XVII la competencia por los pastos con el ganado vacuno se intensificó en gran medida en el área de las Marismas, debido a cuestiones socioeconómicas; lo que produjo una cierta retracción de la producción equina de las Marismas, si bien se mantuvo su riqueza secular.

En el siglo XVIII se produjo un punto de inflexión en la cría equina con la llegada de la ilustración a la cría equina. Muñoz Bort (2004), en su libro apunta que en este siglo la cría caballar tradicional integró “los nuevos vientos de la modernidad y la crítica racional”, haciendo referencia al año 1791 como año en el que el Ministerio de la Guerra nombró a Pomar como Comisionado y ordenó textualmente: “que recorra todas las provincias de España, empezando por *las Andalucías* ; examine e informe el estado en que se hallan las yegadas respectivas, sus pasos ó dehesas, caballos padres, y lo que en el día se practica ó convenga practicar para su adelantamiento y mejora, por ser su Real voluntad dar fomento á este ramo, y que sea lucrativo al paso que se aumente el número de caballos par todo servicio y transporte á que son aplicables...”.

En los siglos XIX y XX acontecieron en la región de las Marismas algunos hechos importantes para la cría caballar: En primer lugar, muchas áreas de pastos se transformaron en regiones de alto valor cinegético con el nacimiento de lo que se conoce como Coto de Doñana. Esto produjo una restricción de la cría caballar con los sistemas tradicionales, favoreciendo la intensificación de la cría equina en la región, lo que unido a la influencia de los programas de mejora equina del ejército mediante las famosas paradas de sementales, probablemente supusiera la separación del Caballo Marismeño del Caballo de las Retuertas de Doñana.

El Marismeño quedó en manos de los ganaderos que fueron mejorando su estructura y conformación haciéndolo un animal más comercial y funcionalmente competitivo, mediante el uso de sementales españoles y de otras razas foráneas. La fijación de estos cruzamientos dio lugar al actual Caballo Marismeño, reconocido por el Ministerio de Agricultura como raza Autóctona Española de Protección Especial. Los estudios genéticos desarrollados por el grupo de investigación PAIDI AGR 218

definen a esta raza como muy próxima al actual caballo español y detecta las mencionadas influencias de razas extranjeras, aunque se aprecian individualidades dentro de esta raza un gran paralelismo genético con el caballo de las Retuertas de Doñana, que justifica sus relaciones filogenéticas de base.

El caballo de las Retuertas de Doñana, por su parte, comenzó su proceso de asilvestramiento, debido por un lado al abandono de las tareas agrícolas a favor de las cinegéticas, y a la mecanización del campo. Estos caballos quedaron deambulando con muy escaso o ningún manejo por parte de sus dueños por los pastizales de Doñana. Muñoz Bort (2004) en su interesante libro cita literalmente a Chapman y Buck (1910) refiriéndose a estos caballos mostrencos que se encuentran en la región diciendo “la escasa población de Doñana incluye unos cuantos vaqueros que vigilan el ganado vacuno y los caballos que vagan en estado semisalvaje por la zona de monte bajo y en la marisma abierta”.

Estos animales, tras la declaración del Parque Nacional a principios del siglo XX, quedaron recluidos en las áreas más protegidas del Parque y más concretamente en la Reserva Biológica de Doñana, la cual está compuesta por dos fincas que pertenecen a la Estación Biológica de Doñana (CSIC) con 7.000 y 3.000 ha (el Coto y Guadamar), cercadas y separadas por otra intermedia. Estas dos fincas tienen el estatus de Reserva Científica y mantiene grandes medidas de control.

Por tanto, se puede decir, que esta raza se encuentra emparentada en origen con el Caballo Marismeño. Pero, mientras el caballo Marismeño muestra todavía una gran heterogeneidad genética fruto de los recientes cruzamientos que han dado lugar a su configuración actual, el caballo de las Retuertas de Doñana se aprecia muy uniforme y extremadamente adaptado a su vida asilvestrada. Algo evidente a nivel morfológico y funcional, que se ha contrastado a nivel genético como se verá en capítulos posteriores.

Dentro del funcionamiento de la Estación Biológica de Doñana, ha existido en las últimas décadas una controversia sobre estos animales, ya que mientras algunos estudiosos del mundo salvaje no entendían muy bien cuál era el papel de los animales domésticos dentro de un espacio protegido, en el que ocasionan molestias a las nidificaciones e interactúan negativamente con la fauna salvaje, como portadores de patologías a la vez que compiten por el alimento, otro grupo de científicos comprendía con claridad el papel de los animales domésticos en una región que fue pastoreada por animales domésticos desde tiempos de los Tartesos.

Investigadores liderados por el Dr. D. Juan Calderón deseaban conocer la importancia de esos animales que desde siglos atrás vivían integrados en el ecosistema en absoluto equilibrio, y estimuló su estudio para encontrar razones para su conservación o para su erradicación.

El Dr Calderón, a la espera de resultados fehacientes y ante la gran amenaza que se cernía sobre estos animales, implantó un programa de conservación sobre la escasa población existente que consistió en la absorción con sementales de Las Retuertas de una población situada en la finca de Guadamar.

2.2 DESCRIPCIÓN MORFOLÓGICA

Los grupos genéticos diferenciados, sean razas u otras estructuras subraciales como las variedades, estirpes, ecotipos, etc, deben poseer unas características heredables que los identifican entre sí y los diferencian frente al resto de la especie a la que pertenecen.

La identificación de esas características es lo que se conoce como caracterización, y el conglomerado de características que definen a las poblaciones se define como patrón racial.

Tradicionalmente, desde que Backewell, en la Inglaterra posterior a la Ilustración, impusiera sus criterios zootécnicos y con ellas, el concepto de raza tal y como se entiende hoy, se aceptó que la caracterización de las poblaciones animales era eminentemente morfológica. En este sentido, se establecía un paralelismo con los métodos de actuación de los taxónomos en Biología.

Desde Linneo, las identificaciones taxonómicas de las especies se apoyaban estrictamente en los caracteres morfológicos cualitativos y cuantitativos, y así se fueron catalogando las especies conocidas.

La etnología animal o zooetnología se basó en la caracterización morfológica para identificar las razas y demás estructuras genéticas. Si bien, a diferencia de los taxónomos, los etnólogos tenían en cuenta también características funcionales, aunque sólo cuando existía la posibilidad de realizar un control de rendimientos, que no era siempre.

Hasta el primer tercio del siglo XX, las herramientas morfológicas y funcionales eran las únicas a nuestra disposición y, con ellas, se establecieron los elencos raciales de los países.

A pesar de ser España cuna de ilustres zooetnólogos, como el destacable Dr. Aparicio Sánchez, nuestro país se incorporó tarde a la etnología moderna; ya que, hasta principios del siglo XX, nuestras razas eran definidas más por criterios geográficos y culturales que por morfología y funcionalidad.

Hasta los años treinta, en las exposiciones nacionales se nombraban a las razas por toponimia. Por ejemplo: se hablaba de la raza bovina Andaluza, con sus variedades roja, negra y cárdena; sin duda, se referían a las razas actuales Retinta, Negra Andaluza y Cárdena Andaluza, animales muy bien diferenciados en origen y apariencia.

Como quiera que fuera, el último tercio del siglo XX fue toda una revolución en la caracterización racial de los animales domésticos: al igual que en el mundo salvaje, los científicos consiguieron acceder a algunos caracteres genéticos que eran neutros; es decir, que permanecían al margen de la mano del hombre en su dinámica genética, no se veían afectados por la selección artificial.

Primero fueron los polimorfismos bioquímicos, luego los marcadores inmunogenéticos como los grupos sanguíneos y los antígenos del Sistema Mayor de Histocompatibilidad, pero lo que supuso un gran avance fue la aparición en escena de los marcadores moleculares y, en especial, los microsatélites.

Estas herramientas genéticas permitieron realizar una caracterización molecular de las poblaciones y con esto surgió -tanto a nivel zootécnico como biológico, en general- una nueva consideración en clasificación de especies y de razas. Incluso surgieron ciertos conflictos entre los morfólogos y los genetistas. Algunas especies que se habían considerado diferentes durante siglos, eran reducidas a la categoría de subespecies y a veces ni eso. Del mismo modo, ante algunas razas consideradas diferentes quedaba demostrado que, genéticamente, eran la misma.

También, poblaciones que se habían clasificado como diferentes pasaban a ser consideradas como iguales.

Hoy en día, por tanto, existen tres fuentes de información objetiva a la hora de diferenciar poblaciones genéticas entre sí:

- Morfológicas
- Funcionales
- Marcadores genéticos

Se puede asegurar que ninguna de ellas es nada sin el resto. Es necesario contar con información global en esto tres sentidos para conseguir una eficaz caracterización racial (Delgado *et al.* 2001)

Al margen de esta caracterización de las poblaciones, *FAO* da mucha importancia a la caracterización cultural, ya que defiende en su definición que es posible reconocer a una raza como tal, tan solo por la consideración cultural de un pueblo y una tradición, incluso por encima de los criterios objetivos como los apuntados más arriba.

El Caballo de las Retuertas de Doñana, en cuanto a sus facetas histórico-culturales, ha quedado suficientemente definido y caracterizado en el apartado anterior. A continuación se expondrá su caracterización genética en tres apartados: morfológico, funcional y mediante marcadores genéticos.

Para realizar esta caracterización, se siguieron los protocolos generales asumidos por la Sociedad Española para los Recursos Genéticos Animales (*SERGA*), que coinciden con los aplicados en la Red Iberoamericana sobre la conservación de la Biodiversidad de los Animales Domésticos Locales para el Desarrollo Rural Sostenible (Red *CONBIAND*), la cual cuenta con más de 200 miembros en España y por encima de los 300 implicados en 17 países Iberoamericanos y observadores; todos ellos, científicos especialistas en conservación de recursos Zoogenéticos implicados en los Puntos Focales Regional Europeo y Sudamericano dentro del programa de *FAO*.

Llegado a este punto, es necesario diferenciar entre dos conceptos que suelen prestarse a confusión: descripción y caracterización.

La descripción implica tan solo una lectura de los estadísticos centrales y dispersivos obtenidos de un muestreo correcto de una determinada población. Con esto se consigue definir su perfil genético, bien sea morfológico, funcional o basado en marcadores.

La caracterización conlleva una comparación con otras poblaciones en el contexto histórico, cultural y geográfico de la población estudiada además de alguna población control, para conseguir su diferenciación frente al resto de su especie.

Se debe tener en cuenta que sólo la caracterización basada en marcadores permite realizar comparaciones directas utilizando información obtenidas en distintos laboratorios sobre distintas poblaciones, ya que existen convenciones internacionales patrocinadas por instituciones de prestigio como *FAO* e *ISAG*.

Los caracteres funcionales, a pesar de estar muy bien definidos -en cuanto a su medición- con protocolos internacionalmente asumidos, propuesto por el *ICAR* (Internacional Committee for Animal Recording), exigen la obtención de las mediciones por parte del mismo operario, con los mismos instrumentos de medida y bajo las mismas circunstancias, algo imposible en este tipo de caracteres. Por

tanto, para realizar comparaciones interraciales funcionales es necesario que toda la información haya sido recogida por el mismo equipo, de acuerdo a los mismos protocolos.

Algo similar ocurre con las características morfológicas: No existe ningún tipo de convenio internacional sobre los protocolos a seguir; y, aunque los hubiera, la naturaleza de los caracteres exige la obtención de toda la base muestral para el estudio de discriminación por parte del mismo equipo y con las mismas condiciones.

Delgado *et al.* (2001) recomiendan el siguiente protocolo para la caracterización morfológica de las poblaciones de animales domésticos:

1. Diseño del muestreo y plan de mediciones.
2. Creación de bases de datos.
3. Cálculo de estadísticos descriptivos.
4. Análisis de la Varianza para cada variable entre las poblaciones implicadas en el estudio.
5. Análisis discriminante canónico.
6. Establecimiento de distancias de Mahalanobis entre poblaciones.
7. Construcción de Clusters con las relaciones filogenéticas estimadas mediante las distancias.

La aplicación de estos siete pasos concluiría con la caracterización morfológica de la población, mientras que la utilización de sólo los tres primeros pasos nos da la descripción morfológica de la raza.

La descripción morfológica del caballo de las Retuertas de Doñana se realizó en distintas fases:

En una primera, se muestrearon 25 individuos mayores de tres años (16 hembras y 9 machos) publicándose los resultados preliminares (Vega-Pla *et al.* 2005).

Posteriormente, se añadieron -en el seno del proyecto de la convocatoria de Recursos Genéticos de Interés Agroalimentarios del INIA- las medidas de otras 16 hembras y dos machos más.

Finalmente, se midió el total de la población de ejemplares de Las Retuertas.

Actualmente, se dispone de un perfil morfológico claro y eficaz para el apoyo del programa paralelo de absorción que se está desarrollando.

Se recogieron cuatro características de tipo cualitativo:

- Perfil fronto-nasal
- Color de la capa
- Color de las mucosas
- Tipo de pelos

Así como catorce variables cuantitativas, elegidas de acuerdo a su significación en la definición racial y por la capacidad de medición correcta teniendo en cuenta el carácter asilvestrado de los animales.

Las variables cuantitativas fueron las siguientes:

- Alzada a la cruz. Distancia desde el suelo hasta el punto más alto de la cruz (Región interescapular). Tomada con Bastón zoométrico.
- Alzada al medio de la espalda. Distancia desde el suelo hasta el punto más declive de la espalda. Tomada con bastón zoométrico.

- Alzada la grupa. Distancia desde el suelo hasta el punto más alto de las tuberosidades internas del ileon. Tomada con bastón zoométrico.
- Alzada la inserción de la cola. Distancia desde el suelo hasta la parte superior de la inserción de la cola. Tomada con bastón zoométrico.
- Longitud de la grupa. Distancia entre el borde anterior de la tuberosidad iliaca externa y la tuberosidad isquiática. Tomada con compás.
- Longitud de la cabeza. Distancia desde el punto más culminante de del occipital al más rostral del labio maxilar. Tomada con compás.
- Anchura de la grupa. Máxima distancia entre los bordes anteriores de las dos tuberosidades iliacas. Tomada con compás.
- Anchura de la cabeza. Distancia entre los puntos más prominentes de los arcos zigomáticos. Tomada con compás.
- Diámetro longitudinal del cuerpo. Distancia entre el punto más craneal y lateral de la articulación escápulo-humeral y el punto más caudal de la tuberosidad isquiática. Tomada con bastón zoométrico.
- Diámetro dorso-esternal. Distancia entre el punto más declive de la cruz al borde ventral del esternón, detrás del codo. Tomada con bastón zoométrico.
- Diámetro transversal del cuerpo. Máxima amplitud del tórax a la altura de la quinta costilla y por detrás del codo. Tomada con bastón zoométrico.
- Perímetro recto del tórax. Longitud medida alrededor del cuerpo a la altura del punto más declive de la cruz, ambos costados y el esternón, pasando por detrás del codo. Tomada con cinta.
- Perímetro de la caña. Medida de la circunferencia alrededor del metacarpo en su tercio superior.
- Perímetro del casco. Medida de la circunferencia alrededor de la parte proximal del casco.

Tras analizar los faneros, cabos y extremos no se obtuvieron una gran uniformidad ya que el color de la capa predominante es el Castaño (94,5%), siendo tordos en el restante 5,5%. Por tanto, a este nivel, la homogeneidad de los animales es casi total. La pigmentación de las mucosas siempre es oscura y el tipo de pelo, fino y corto. El perfil frontonasal es siempre subconvexo.

En la Tabla 1 se muestran los estadísticos descriptivos obtenidos del análisis de las catorce variables morfológicas cuantitativas estudiadas. En todos los casos se aprecia unos valores promedio en los rangos de la especie para caballos de este tipo de sangre y unas medidas de dispersión, desviación típica y coeficiente de variación porcentual, que destacaron la gran uniformidad de los animales, tanto machos como hembras. De cualquier forma, el dimorfismo sexual es evidente, con una superioridad de los machos en la mayoría de las medidas.

Tabla 1: Estadísticos descriptivos de las mediciones de toda la población de ejemplares de la raza caballo de las Retuertas de Doñana.

Variables	Media machos (cm)	DT machos	CV (%)	Media hembras (cm)	DT hembras	CV (%)
Alzada a la cruz	145,33	2,74	1,89	140,44	3,22	2,29
Alzada a la mitad de la espalda	138,25	3,58	2,59	137,25	4,45	3,24
Alzada a la entrada de la grupa	139,25	4,65	3,34	139,75	4,27	3,06
Alzada a la inserción de la cola	125,75	7,05	5,6	125,88	6,41	5,09
Longitud de la grupa	48,63	2,33	4,79	48,50	2,00	4,12
Longitud de la cabeza	49,44	2,07	4,19	48,80	1,32	2,70
Anchura de la grupa	45,63	3,34	7,32	49,25	1,77	3,59
Anchura de la cabeza	24,56	1,31	5,33	20,80	1,01	4,86
Diámetro longitudinal del cuerpo	142,78	3,56	2,49	145,94	6,55	4,49
Diámetro dorso-esternal	65,44	2,30	3,51	66,94	2,29	3,42
Diámetro transversal del cuerpo	45,00	3,66	8,13	45,44	2,26	4,97
Perímetro recto del cuerpo	171,75	7,11	4,14	174,81	5,17	2,96
Perímetro de la caña	18,22	0,95	5,21	17,55	0,91	5,19
Perímetro del casco	34,23	1,31	3,83	32,64	1,02	3,13

DT= Desviación típica. CV= Coeficiente de variación.

Es preciso destacar que las medidas zoométricas presentan una fuerte influencia del medio ambiente, tanto con efectos temporales (estado nutritivo del animal), como permanente (circunstancias durante el crecimiento), y también de los efectos de muestreo expresados por defectos de la medición en especial en razas asilvestradas como es este caso.

De acuerdo con los resultados obtenidos se concluyó el siguiente estándar racial para el caballo de las Retuertas de Doñana (Imagen 2).



Imagen 2. Ejemplar de caballo de las Retuertas

- *Aspecto general.*

Es un animal eumétrico, mediolíneo y subconvexo (Imagen 2), que presenta un marcado dimorfismo sexual. El cuerpo de estos animales es armónico con un aspecto elegante y de movimientos fuertes, rítmicos y elásticos. En todo momento muestra su carácter asilvestrado con gran integración en su contexto medioambiental.

- *Cabeza.*

El tamaño de la cabeza está proporcionado con el resto del cuerpo mostrando un tamaño medio, del mismo modo la longitud y la anchura de la cabeza se muestran equilibradas. El perfil fronto-nasal es subconvexo y termina en un hocico acuminado. Las orejas son ligeramente cortas móviles y bien insertadas. La frente es plana y no muy ancha. Los ojos muestran una gran expresión y las órbitas no son prominentes. La cara es larga con ollares no muy evidentes. Los labios son gruesos y los mentones prominentes.

- *Cuello*

La anchura y longitud de del cuello es media, está bien insertado en el tórax y mantiene una cierta curvatura en la parte superior. Se manifiesta una robustez superior en los machos que en las hembras, pero siempre manteniendo la armonía.

- *Tronco*

El tronco se aprecia bien desarrollado con máximo equilibrio entre los tercios posteriores y anteriores en ambos sexos. La espalda es de corta a media en longitud, con apariencia fuerte y redondeada. La cruz y el costillar son amplios y profundos además de bien musculados. La línea inferior del tórax corre horizontal. Los lomos son de mediana longitud, bien desarrollados y musculados. La grupa es redonda y ligeramente derribada. De manera natural la inserción de la cola es baja.

- *Extremidades*

Presenta muy buenos aplomos en ambos sexos. Las extremidades están bien musculadas, pero mantienen la armonía con el resto del cuerpo. Los antebrazos largos bien musculados se prolongan hasta los hombros prominentes y largos. Las rodillas son planas y bien definidas. La caña es ligeramente

corta mostrando un tendón muy bien definido. Los corvejones están bien distinguidos también con fuertes tendones, con gran compacidad de la piel que la cubre y con una ligera mayor angulación que otras razas de sangre templada. El casco es fuerte, redondo y de buen tamaño.

- *Capa, piel y pelo*

Predominantemente castaña apareciendo con frecuencia un mosqueado blanco sobre la capa, presenta también tordos mosqueados.

- *Características del comportamiento*

El comportamiento de estos animales es muy diferente cuando se crían en condiciones asilvestrada que cuando lo hacen en condiciones domésticas. En el pasado, cuando era frecuente su cría para el trabajo eran animales tranquilos, nobles aunque rústicos; mientras que en condiciones de asilvestramiento, son muy excitables ante la presencia humana y muestra una gran dificultad de manejo. En todo caso muestra movimientos armónicos y gráciles con intensa elevación de las extremidades, pero también con moderadas extensiones, ofreciendo pasos largos y rítmicos.

En la actualidad se comportan como caballos salvajes, tomando actitudes defensivas de grupo ante la presencia del ser humano. De manera común se organizan en grupos llamados tropas que son dirigidos por un semental líder, el cual expulsa del grupo a cualquier macho que pueda alterar su dominio. Este comportamiento ha protegido a estos animales del cruzamiento, ya que algunas intromisiones del exterior de la reserva siempre han concluido con la expulsión inmediata del intruso, sin dejarlo fertilizar a hembra alguna. Incluso llegan a dañar físicamente a cualquier macho que intenta discutirle su preponderancia.

Las hembras mantienen su fidelidad al líder mientras éste domina, siendo casi imposible la formación de nuevas tropas con hembras adultas.

A pesar de compartir ancestros con el caballo español y el Marismeño, muestra una gran diferenciación con respecto a estas razas. Al carecer de demanda comercial debido a su aspecto primitivo y ambiental su distribución queda restringida en la actualidad a las áreas protegidas de la Reserva Biológica de Doñana, donde se constituye en un elemento más del ecosistema.

Además, es de resaltar que a ojos de los expertos, existen grandes similitudes morfológicas entre estos animales y muchas razas Latinoamericanas. De entre ellas se puede destacar el Mustang Americano, el caballo Andino, el Caballo Nordesteño Brasileño, el Marajoara, y también los criollos Argentino y Uruguayo. Por el contrario, en la Península Ibérica no se encuentra ninguna raza con similitudes tan claras con respecto al caballo de las Retuertas de Doñana.

- *Caracteres etológicos*

Los individuos pertenecientes al caballo de las Retuertas de Doñana cuando son observados en su ambiente salvaje se presentan como unos animales perfectamente integrados en el medio y a la forma de vida silvestre. Su comportamiento es absolutamente ancestral.

Se organiza por “tropas” de yeguas gobernadas por un semental maduro, admitiendo la presencia de algunos machos jóvenes en actitud de subordinación. Muestran un comportamiento de defensa frente al ser humano, adquiriendo las tropas una formación defensiva ante la presencia del ser humano, que consiste en un agrupamiento de las yeguas manteniendo las crías en medio, y un avance del macho líder en actitud hostil, llegando incluso al ataque.

Este tipo de comportamiento es único en los equinos españoles, y sólo ha sido referido en las razas asilvestradas Americanas (Spoonenberg, comunicación personal).

Por el contrario, cuando los animales son mantenidos en condiciones domésticas, como ocurría en el pasado, se destacaba en ellos una gran aptitud para el aprendizaje de las tareas agrarias, mostrando una excelente resistencia, nobleza y tranquilidad.

- *Aires*

Se trata de un animal armónico y equilibrado que ha modelado su físico para integrarse en un ambiente muy peculiar y hostil, como son las llanuras encharcadas y marismas.

Por ello sus movimientos son gráciles y ágiles a pesar de mantener todas las exigencias que le pone su medio ambiente.

En los tres aires se destaca la armonía y belleza de los movimientos de este animal, destacando la elevación intensa de las extremidades aunque manteniendo una extensión moderada de los miembros. En algunos momentos recuerda en la distancia algunos de los movimientos del caballo español y del paso fino peruano, ya que de forma natural y ausente de entrenamiento presenta unos pasos largos y rítmicos.

- *Funcionalidad potencial*

Atendiendo a sus tamaño, su carácter y sus movimientos peculiares, así como su capacidad para la doma, acompañados de su extrema adaptación al medio se nos sugiere la posibilidad de utilizar estos caballos como un aliciente más para el turismo ecológico que visita Doñana y su entorno, así como para el uso personal de los investigadores de distintas áreas que se mueven diariamente en el parque.

Este uso doméstico se podría llevar a cabo con los animales sobrantes de las censos admitidos en el seno del parque, y como medio para potenciar su programa de conservación.

2.3 DESCRIPCIÓN FUNCIONAL

Probablemente este sea el aspecto más propiamente zootécnico de la descripción y caracterización de las poblaciones de animales domésticos; ya se trate de razas o de estructuras subraciales como variedades, ecotipos, etc. Un animal doméstico no solo queda definido por sus características morfológicas y por marcadores genéticos, como las poblaciones salvajes. A los animales domésticos además se les exige unas peculiaridades funcionales que los diferencia frente al resto de la especie a la que pertenece.

Dicho de una forma coloquial “un animal puede tener el aspecto de una determinada raza, pero si no produce lo que se espera de él, no pertenece a dicha raza”.

Existe una gran inquietud mundial por el establecimiento de métodos homologables a nivel internacional para el estudio de las producciones de los animales. Para ello se hizo necesario el establecer una serie de convenciones a las que se han ido adhiriendo los distintos estados. En este aspecto se debe destacar el papel de FAO (1998a) que propuso una serie de medidas generales para el control de rendimientos y además justificó su utilización para la caracterización y descripción de las razas.

De cualquier forma fue el Comité Internacional para el control de Rendimientos animales (ICAR; www.icar.org), el que se encargó de homogeneizar los criterios aplicados en los distintos países para estos menesteres de una manera específica.

ICAR (2007) se define como una organización internacional para la estandarización de la identificación, el control productivo y la evaluación de los animales de granja. Para ello emite normas que son asumidas por todos los países firmantes del acuerdo, entre ellos España.

En la mayoría de las especies domésticas, para desarrollar una caracterización funcional admisible oficialmente en nuestro país, sería necesario seguir los criterios de un acuerdo que nuestros gobernantes hubieran y que estuvieran recogidos en las normas de ICAR (ICAR, 2007). Pero en el caso de la especie equina no es posible ya que no existe una convención internacional que defina los criterios de recogida de información funcional.

Según el protocolo de actuación recomendado por Delgado *et al.* 2001, para la caracterización funcional de las poblaciones de animales domésticos, se deben seguir los mismos pasos que para la caracterización morfológica:

- Diseño del muestreo y plan de mediciones.
- Creación de bases de datos.
- Cálculo de estadísticos descriptivos.
- Análisis de la Varianza para cada variable entre las poblaciones implicadas en el estudio.
- Análisis discriminante canónico.
- Establecimiento de distancias genéticas entre poblaciones.
- Construcción de Clusters con las relaciones filogenéticas estimadas mediante las distancias.

Por tanto, al igual que en el aspecto morfológico, la aplicación de los tres primeros puntos sería suficiente para describir a una raza o variedad; pero, para concluir su caracterización, sería necesario comprobar su situación con respecto al resto de los grupos que forman la especie, o al menos con respecto a los que se le presume una relación histórica, cultural o geográfica, en su contexto.

En el Caballo de las Retuertas, la realización de test de aptitud funcional se hace muy compleja, por su difícil manejo, aunque se disponga de referencias como la utilización de estos animales en el pasado como animal de trabajo, en el entorno de Doñana. Por tanto, para su caracterización funcional se recurrió a las apreciaciones de los expertos, sin poder presentar ninguna propuesta con datos estadísticos.

2.4 CARACTERIZACIÓN GENÉTICA

Dentro de los criterios utilizados para la caracterización racial de los animales, los marcadores genéticos son expresión de modernidad y eficacia, si bien, como ya se expuso con anterioridad, por sí solos no aportan nada. La utilización de estos métodos genéticos para la contratación de observaciones externas basadas en criterios morfológicos y funcionales es imprescindible.

Hoy en día no se justifica de ningún modo que una caracterización racial no venga acompañada de un estudio genético, ya que es la única forma objetiva de comprobar que las propuestas morfológicas y funcionales de diferenciación son ciertas.

Este tipo de caracterización se basa en la detección del polimorfismo en la expresión genética de fragmentos activos del ADN en forma de proteínas o enzimas y también de la observación directa del

polimorfismo de fragmentos hipervariables del ADN. Se entiende como polimorfismo como la existencia en las poblaciones estudiadas de variantes en la forma, pero no en la naturaleza de de las estructuras estudiadas.

La ventaja de estos caracteres frente a los funcionales y morfológicos es que no se ven y por tanto son neutros a la selección artificial, algo de sumo interés para observar la diferencia real entre poblaciones y no sólo la inducida por el ser humano, que atañe a una pequeña parte del genoma.

Con esto es posible aclarar como dos poblaciones aparentemente similares son realmente muy distantes, o por el contrario, como dos poblaciones aparentemente distintas mantienen una identidad genética muy grande. Por ello, la caracterización basada en marcadores moleculares supone la prueba definitiva para considerar una raza o una variedad como tal o no.

Al contrario de lo que ocurre con los caracteres funcionales y morfológicos, los marcadores moleculares cuentan con una convención internacional que permite que la información generada en un laboratorio sea homologable y utilizable en otros laboratorios de todo el mundo, siempre que estos estén sometidos a test de intercomparación. Esto ha permitido que instituciones de gran prestigio mundial como *FAO* e *ISAG* hayan implantado protocolos de actuación que son seguidos por todos los laboratorios importantes del mundo, donde destaca el programa *MODAD* (*FAO* 1998b) y los resultados de los test de intercomparación bianuales (comparion test) de *ISAG*.

2.4.1 *Polimorfismos bioquímicos*

Los distintos métodos electroforéticos permiten separar distintas formas moleculares que puedan tener una proteína presente en todos los individuos de una determinada población. La influencia del campo eléctrico sobre las proteínas disueltas en solución acuosa hace que sus distintas formas migren a velocidad distinta desde un polo a otro en función de su carga y masa, separándose de esta forma en fracciones sencillas.

En España hay una larga tradición de utilización de estas técnicas desde principios de los ochenta con un triple objetivo: por un lado el apoyo al control genealógico, en segundo lugar en la búsqueda de ligamiento genético con caracteres de interés económico y en tercer lugar para la caracterización genética de las poblaciones.

En la especie equina es el Laboratorio de Genética Molecular de Cría Caballar, conocido en los años ochenta como Laboratorio de Grupos Sanguíneos, el centro que destacaba a nivel nacional en la utilización de estas técnicas, manteniendo un gran reconocimiento internacional. Este laboratorio, por tanto, posee una extraordinaria experiencia en el control genealógico equino basado en la información bioquímica e inmunogenética, pero también la utilización de los mismos en la caracterización racial, incluso de la raza más emblemática de nuestro país, el caballo Español (Rodríguez *et al.* 1992)

2.4.2 *Marcadores microsatélites*

Con el advenimiento de la tecnología del *ADN* recombinante en los años setenta se consiguió una nueva oportunidad para la identificación de marcadores genéticos; esta vez, el polimorfismo se detectaba directamente sobre las propias moléculas de *ADN*.

Los microsatélites son marcadores moleculares conocidos como SSRs (Simple Sequence Repeats), STRs (Short Tandem Repeats), SSLPs (Simple Sequence Length Polymorphisms), SSMs (Simple Sequence Motifs), STMs (Sequence Target Microsatellites). Son regiones no codificantes de *ADN* compuestas por moléculas de 1 a 6 nucleótidos repetidas en tándem (Fries *et al.*, 1990; Goldstein and

Pollock, 1997; Mommens *et al.*, 1999). Se encuentran distribuidos al azar por todo el genoma, son muy abundantes, exhiben gran polimorfismo y son fáciles de identificar. Estas circunstancias hacen que se utilicen como marcadores genéticos. Los microsatélites han sido ampliamente utilizados como marcadores moleculares y tienen el particular atributo de sufrir tasas de mutaciones más altas que en el resto del genoma (Jarne, 1996). Se han planteado muchas hipótesis sobre la función de los microsatélites, una de ellas es que pueden tener una función sobre la estructura de los cromosomas (Nordheim and Rich, 1983) y, aunque la función de este DNA no se ha determinado completamente, se cree que podría actuar como punto focal para la recombinación genética durante la meiosis (Gross and Garrad, 1986).

La ventaja de los microsatélites son su estabilidad y la posibilidad de realizar reacciones denominadas *múltiplex*, amplificando varios *loci* al mismo tiempo (Kimpton *et al.*, 1993). Por otra parte, su análisis se ha facilitado con el uso de fluorocromos y secuenciadores automáticos de ADN.

A. CLASIFICACIÓN Y ORIGEN DE LOS MICROSATÉLITES

Los microsatélites se clasifican según el tipo de repetición en las secuencias, como perfectos, imperfectos, interrumpidos o compuestos.

Microsatélites perfectos: las secuencias repetidas no son interrumpidas por ninguna base que no pertenezcan a las mismas, como por ejemplo: GAGAGAGAGAGA.

Microsatélites imperfectos: son reconocidos porque existe un par de bases entre las secuencias repetidas que no coincide con la misma, como el caso de la siguiente secuencia, TATATATGTTATATATA.

Microsatélites interrumpidos: se observa una pequeña secuencia que no corresponde a las repeticiones, CGCGCGCGTAGCCG.

Microsatélite compuesto: contiene dos secuencias distintas adyacentes, CGCGCGCGTATATATATATA (Oliveira *et al.*, 2006).

El origen de los microsatélites aun no está claro. Es posible que se deba a la ocurrencia inicial de una secuencia corta al azar u originada por mutaciones en la secuencia *poli dA* en el extremo 3' de una secuencia *Alu* adyacente. En este proceso se observa una prevalencia selectiva de (*dC-dA*), explicada por la metilación de residuos *dC* en la secuencia 5'*dGdC3'* que se encuentra normalmente en el genoma. Los residuos *dC* metilados pueden ser deaminados produciendo una transición de *dC* a *dT*. Este proceso puede llevar hacia un incremento de la secuencia 5'*dG-dT3'* y su complementario 5'*dC-dA3'* y la subsecuente expansión de estas secuencias puede ser debida a un proceso en el ADN denominado "*strand lippage*" o deslizamiento de la hebra, creando polimorfismos en la longitud, separados por algunas repeticiones en el tiempo (Koreth *et al.*, 1996).

De todos los marcadores moleculares existentes hoy en día, han sido los microsatélites los que han demostrado una mayor eficacia en los usos zootécnicos que tradicionalmente se les daba a los polimorfismos bioquímicos, y marcadores inmunogenéticos. Es decir, para el control genealógico, la identificación animal, y sobre todo para la caracterización de poblaciones (entre ellas las razas domésticas).

Organizaciones internacionales en las que participa España como son la FAO, la ISAG la FEZ, el ICAR, destacan a los microsatélites como las herramientas de elección para los objetivos mencionados. Tanto es así, que algunas de ellas como FAO e ISAG han creado un consenso internacional

recomendando paneles de aplicación y estimulando la realización de test de intercomparación entre laboratorios para poder hacer a los resultados obtenidos utilizables por cualquiera que esté homologado.

Este es el caso del laboratorio encargado de realizar la caracterización genética del caballo de las Retuertas de Doñana: El Laboratorio de Investigación Aplicada de Cría Caballar es uno de los pocos laboratorios españoles que se encuentra homologado a nivel internacional para realizar este tipo de estudios, ya que participa siempre en los test de intercomparación realizados por la ISAG. Esto hace que sus resultados automáticamente sean asumidos por todos los laboratorios de élite del mundo especializados en genética equina.

Las razones de elección de los microsatélites son variadas, pero es destacable su bajo coste, su repetibilidad entre laboratorios, su gran polimorfismo, su herencia codominante que permite detectar la expresión de todos los alelos, la posibilidad de extrapolación de herramientas, etc.

B. APLICACIONES DE LOS MICROSATÉLITES EN GENÉTICA ANIMAL

Los marcadores microsatélites han sido utilizados ampliamente para estudios de caracterización y diversidad genética, relaciones genéticas entre poblaciones, influencia de una o varias razas sobre otra (*admixture*), pruebas de paternidad, consanguinidad, cuellos de botella genéticos, entre otros. Son una herramienta poderosa para determinar la diferenciación genética entre especies domésticas (Martínez *et al.*, 2000)

En el caso de los estudios de caracterización y diversidad genética, los índices que se emplean con mayor frecuencia son: Heterocigosis observada y esperada, frecuencias alélicas, contenido de información polimórfica, número medio de alelos y número efectivo de alelos.

- *Heterocigosis*

Proporción de individuos de una población que presenta dos alelos diferentes en un *locus* concreto. Del concepto de Heterocigosis se originan la Heterocigosis observada (*Ho*) y la esperada (*He*).

La *Ho* se obtiene dividiendo el número de individuos heterocigotos para cada *locus* por el total de individuos analizados. La *Ho* media para varios *loci* es una buena medida del grado de variación genética (Aranguren, 2002).

La *He* es la probabilidad que dos alelos seleccionados aleatoriamente sean diferentes en una población en equilibrio. Es calificada como una medida más apropiada de la variación genética y conocida como índice de diversidad genética de *Nei* (Nei, 1987),

El cálculo de la *He*, puede realizar mediante la ecuación:

$$He = 1 - \sum p_i^2$$

Donde p_i^2 es la homocigosis.

- *Contenido de Información Polimórfica (PIC)*

Desde el punto de vista cualitativo, un marcador es denominado polimórfico si contiene por lo menos dos alelos. Generalmente, el criterio más utilizado es que un *locus* será polimórfico si el alelo más

común presenta una frecuencia menor al 99% en la población que se encuentra bajo estudio (Shete *et al.*, 2000). Es un parámetro frecuentemente utilizado para medir la capacidad discriminadora de los *loci*. Existen varias ecuaciones matemáticas que lo definen y en todas ellas sus valores varían siempre entre 0 y 1. El cálculo del Contenido de Información Polimórfica (*PIC*) de cada microsatélite se realiza aplicando una fórmula propuesta por (Botstein *et al.*, 1980). Con dicho índice es posible determinar si un marcador es o no informativo: los valores de *PIC* superiores a 0,5 son altamente informativos, valores entre 0,25 y 0,5 son medianamente informativos y los valores inferiores a 0,25 son poco informativos.

El modelo que se utiliza para el cálculo del *PIC* es el siguiente:

$$PIC = \left(1 - \sum_{i=1}^n p_i^2 \right) - \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n p_i^2 * p_j^2$$

Donde:

p_i = frecuencia del alelo *i* para el locus estudiado

p_j = frecuencia del alelo (*i*+1)

n = número de alelos observados

- *Equilibrio Hardy-Weinberg:*

El 10 de julio de 1908, Godfrey Harold Hardy en Inglaterra y Wilhelm Weinberg en Alemania demostraron que las frecuencias génicas de una población, bajo ciertas condiciones, permanecían esencialmente constantes de una generación a otra, constituyendo la denominada Ley de Hardy-Weinberg. La ley se cumple fundamentándose en las siguientes suposiciones:

- Hay apareamientos aleatorios en la población
- No actúan fuerzas de selección
- No existe migración
- No hay mutación

Consideradas, en conjunto, estas condiciones son suficientes para que la población esté en equilibrio, sin embargo se debe tener en cuenta que no implica que se cumplan todas las condiciones enumeradas anteriormente. De hecho, alguna o varias de estas condiciones pueden ser violadas y las frecuencias genotípicas seguir presentando las proporciones predichas por la ley. Por otro lado, existen ciertas condiciones que por sí mismas son capaces de variar las frecuencias esperadas en el equilibrio de Hardy-Weinberg: Una de las condiciones que afecta las proporciones esperadas en el equilibrio de Hardy-Weinberg es el cruzamiento no al azar de los gametos en una población, como el caso de la de la selección artificial por parte de la acción humana.

El equilibrio Hardy-Weinberg es una condición previa en el estudio de la estructura genética de poblaciones, como el caso de los métodos basados en modelos Bayesianos en los que se requiere que la población esté en equilibrio. Bajo esta suposición, cada alelo de cada *locus* en cada genotipo, es una muestra independiente; la idea es asignar, en la medida de lo posible, cada individuo a su grupo (Pritchard *et al.*, 2000),

El procedimiento común de calcular si existen desviaciones del equilibrio Hardy-Weinberg es la de comparar los genotipos observados con los esperados dentro de una muestra. Se usa la prueba de χ^2 para detectar la discordancia de las frecuencias genotípicas para cada combinación *locus*/población. Se construye una tabla de contingencia y se hace un cálculo de χ^2 con los datos de los genotipos observados frente a los esperados. Con este procedimiento se obtienen resultados aceptables cuando el tamaño de la muestra es grande y el número de alelos de cada *locus* es pequeño.

Sin embargo, cuando la muestra es pequeña y la cantidad de alelos es grande los valores de χ^2 no son confiables. Estos inconvenientes se evitan utilizando programas informáticos que generan una distribución sintética de la población a partir de los genotipos observados. Se usan métodos como el de Monte Carlo que unen alelos aleatoriamente en genotipos, repitiendo esta operación por ejemplo 1000 veces, con lo que se produce una serie de nuevas poblaciones que son evaluadas para el HWE haciendo una prueba de χ^2 . Por ejemplo con el programa informático Genepop (Raymond and Rousset 1995) si hay más de cuatro alelos se utiliza la estimación no sesgada (Guo and Thompson 1992).

2.4.3 Estructura y distancias entre poblaciones

Existe una serie de cálculos que son de mucha utilidad para determinar tanto la estructura de las poblaciones que se están estudiando, como para establecer si existe alguna relación entre las mismas. A continuación, se presentan una serie de metodologías que son de utilidad para este efecto:

- *Estadísticos F*

La estructura de las poblaciones consiste en dos partes distintas pero relacionadas: La estructura poblacional y la genética. La estructura de poblaciones las determinan los procesos asociados al nacimiento, muerte y dispersión, incluyendo el sistema de apareamiento y la historia de vida. La estructura genética está determinada por la estructura de la población y los procesos genéticos como la selección, la recombinación y la mutación.

De los tres pioneros de la teoría de la genética de poblaciones: Fisher, Haldane y Wright, este último se interesó en la estructura de las poblaciones y su papel en la evolución. Gran parte del trabajo teórico de Wright puede ser considerado como una demostración de cómo la estructura poblacional determina la estructura genética. Wright propone tres parámetros: F_{IS} , F_{IT} y F_{ST} para medir las desviaciones de frecuencias genotípicas en poblaciones subdivididas.

El estadístico F_{IT} es la correlación relativa a la población total, o índice de fijación de los individuos respecto al total de la población, o desviación de las frecuencias genotípicas observadas en la población total respecto a las esperadas considerando que existe equilibrio Hardy-Weinberg. Si la población total se encuentra en panmixia (individuos con igual probabilidad de cruzarse) el valor sería 0.

El estadístico F_{IS} es la correlación entre dos alelos relativa a la subpoblación, o el exceso o déficit de heterocigotos que podría darse entre individuos de la misma subpoblación. Este parámetro puede variar entre -1 a 1. Valores negativos de F_{IS} indican exceso de heterocigotos en la población respecto a las proporciones esperadas de equilibrio de Hardy Weinberg y valores positivos indican el efecto contrario.

El estadístico F_{ST} es la correlación entre dos alelos tomando al azar uno de cada subpoblación. Ha sido interpretado como el grado de diferenciación genética o flujo genético entre las poblaciones. Se denomina índice de diferenciación genética y su valor varía de 0 a 1. A diferencia del F_{IS} y el F_{IT} , no puede ser un valor negativo (Nei 1973). Un valor de cero indica que las frecuencias alélicas son iguales en las

poblaciones analizadas y por el contrario, un valor de 1 demuestra que las frecuencias alélicas están fijadas y son diferentes en las poblaciones. Valores de 0,00 y 0,05 se consideran bajos; 0,05 y 0,15 indican diferenciación genética moderada y un rango de 0,15 y 0,25 señalan que la diferenciación es alta y valores superiores a 0,25, que la diferenciación es muy alta (Wright 1943; Wright 1978; Montoya, Arias *et al.*, 2005)

Los tres parámetros están relacionados mediante la siguiente ecuación:

$$1 - F_{IT} = (1 - F_{IS}) (1 - F_{ST})$$

Cabe destacar que la idea inicial de Wright se aplicaba al análisis de un solo *locus* y un par de alelos neutrales y número infinito de subpoblaciones aunque existe controversia en la forma de calcularlos, de ahí que Weir y Cockerham (1984) incluyen los parámetros F , θ y f que corresponden con los estadísticos F de Wright:

$$F = F_{IT}, \theta = F_{ST} \text{ y } f = F_{IS}.$$

De la misma forma que los estadísticos de Wright se pueden relacionar, los estadísticos propuestos por Weir y Cockerham se relacionan mediante la siguiente ecuación:

$$f = (F - \theta) / (1 - \theta)$$

Por otro lado, la diferenciación genética se ve condicionada por la tasa de migración (Nm) de manera que cuanto mayor sea el flujo genético entre dos poblaciones, menor será la diferenciación entre ellas. Existe una relación entre la F_{ST} y el Nm expresada mediante la siguiente ecuación descrita por Wright (1969):

$$Nm = 1 - F_{ST} / 4F_{ST}$$

De esta manera un flujo que supera el valor de 1 sería suficiente para que no se considere como poblaciones diferentes (Wright, 1931) y valores por encima de 2 serían suficientes para contrarrestar los efectos de la deriva. Si el valor de Nm es muy bajo, predomina el efecto de la deriva y la mayoría de las poblaciones estarán fijadas. Si Nm es grande, la deriva genética será poco importante y contrarrestada por la migración; por tanto, las subpoblaciones tenderán a mantener las mismas frecuencias génicas.

Otro método para estimar Nm es el de alelos privados (Slatkin, 1981), en el que con base en muestras de distintas localidades se obtiene un valor $p(1)$, que es la media de frecuencia de alelos que están en una muestra. Se encontró que, para el modelo de islas y el de *stepping Stone*, $\log_{10} [p(1)]$ está linealmente relacionado con $\log_{10} (Nm)$, por lo que:

$$\log_{10} [p(1)] = a \log_{10} (Nm) + b$$

Donde $p(1)$ es la frecuencia promedio de los alelos privados y a y b son constantes que dependen del número de individuos muestreados en cada subpoblación y son determinadas por datos simulados (Slatkin, 1985). Este método y la estimación de Nm a partir de F_{ST} son parecidos, al basarse en

la distribución de las frecuencias alélicas entre poblaciones. Sin embargo, simulaciones han demostrado que el método de alelos privados es más sensible a errores en la colección de datos (Slatkin, 1994).

- *Cuello de Botella*

El cuello de botella es una grave reducción en el tamaño de la población y ocurre debido a una presión interna o calamidad, como el caso de enfermedades o pérdidas del hábitat. Pese a que logren sobrevivir un número moderado de individuos a dicho cuello de botella, las frecuencias de los alelos resultarán modificadas aleatoriamente (Starr and Taggart 2004). El cuello de botella es un proceso que puede causar una pérdida más rápida de heterocigosis bajo equilibrio de mutación y deriva, que la pérdida de heterocigosis bajo equilibrio de Hardy-Weinberg. Por lo tanto, poblaciones que han experimentado recientes reducciones en su tamaño efectivo, presentan mayor diversidad alélica (Heterocigosis esperada, H_e), bajo equilibrio de Hardy-Weinberg que H_e bajo equilibrio de mutación y deriva en un número determinado de alelos en una población (Cornuet and Luikart, 1996; Luikart *et al.*, 1998). La distribución de H_e bajo el modelo de mutación y deriva para cada *locus* y población fue obtenida mediante simulación. Existen dos métodos para estimar si la población ha sido afectada por una disminución en su tamaño y la generación de un cuello de botella:

El primer método está basado en tres pruebas que se utilizan para determinar el exceso de Heterocigosis (Cornuet and Luikart, 1996):

- Prueba de signos,
- Prueba de diferencias estandarizadas y
- Prueba de rangos de Wilcoxon,

El otro método, es una representación gráfica del indicador de cambio de moda (Luikart *et al.*, 1998). Éste consiste en agrupar alelos de una muestra con un mínimo de 5 *loci* polimórficos en un histograma de frecuencias de 10 clases.

La conclusión de que una población ha sufrido cuello de botella se basa en que pocos alelos se encuentren en la frecuencia más baja en relación a las frecuencias medias y altas (Luikart, Allendorf, Cornuet and Sherwin, 1998). El exceso de Heterocigosis producido por el cuello de botella es temporal y se detecta por un periodo, que oscila entre 0,2-4,0 N_e generaciones. Posteriormente, se alcanza nuevamente el equilibrio entre mutación y deriva con el nuevo N_e .

- *Análisis Factorial de Correspondencias (AFC)*

El análisis multivariante es un conjunto de métodos estadísticos cuya finalidad es analizar simultáneamente grupos de datos en el sentido de que hay variables medidas para cada individuo u objeto estudiado. Debido a que las variables se consideran simultáneamente, éstas permiten realizar interpretaciones más complejas que en los métodos univariados. El análisis multivariado utiliza las relaciones entre las variables o entre los objetos que el método univariado no considera directamente.

El AFC es una técnica multivariante que analiza las relaciones de interdependencia entre variables. El AFC permite descubrir similitudes entre conjuntos de variables, presentando matrices o tablas de contingencia de frecuencias y valores promedios. Tiene como objetivo encontrar la estructura más sencilla reduciendo la dimensionalidad de las variables sin perder información importante. Para realizar esta reducción se simplifica el número de variables a un pequeño número de índices. Cuando se trabaja con microsatélites se cuenta con el programa Genetix v.4,05 (Belkhir *et al.*, 2003), donde elabora un cuadro que corresponde a una codificación más conveniente para los datos de la genética de los

organismos diploides tal como fue propuesto por (She *et al.*, 1987). Los objetos analizados se ven como una nube de puntos en un hiperespacio que tiene tantas dimensiones como alelos. El algoritmo busca las direcciones independientes en este hiperespacio y la longitud de las cuales es la inercia. Estas direcciones, que son definidas por los vectores propios de la matriz, determinan una serie de ejes factoriales. Por convenio, el primer eje es el que tiene la contribución mayor a la inercia total. Para utilizar los datos genotípicos individuales, cada individuo está representado por su resultado para cada modalidad de cada variable categórica, asignando 0 para la ausencia, 1 para la presencia del alelo en el estado heterocigoto y 2 para el estado homocigoto. El Análisis de Correspondencia puede condensar la información de un gran número de alelos y *loci* en pocas variables sintéticas. Con este método, las frecuencias alélicas de las poblaciones en todos los *loci* se usan como variables y el clúster de cada población se representa gráficamente (Li *et al.*, 2005)

El Laboratorio de Genética Molecular de Cría Caballar (Laboratorio de Genética Aplicada, en la actualidad) es el responsable de la realización de los controles genealógicos de las razas equinas nacionales en España. Este laboratorio está homologado a nivel internacional, por lo que siempre participa en los test de intercomparación desarrollados en el seno de ISAG y, por ello, sus resultados son homologados automáticamente por los diez laboratorios de Genética Animal más importantes del mundo.

Teniendo en cuenta los mencionados antecedentes, cuando el Dr. D. Juan Calderón se dirigió al Grupo de investigación PAI-AGR-218 de la Universidad de Córdoba para realizar una investigación conjunta del valor biológico y zootécnico del caballo de las Retuertas de Doñana, el Dr. Delgado, coordinador del mencionado grupo, de inmediato propuso incorporar al estudio al mencionado Laboratorio de Genética Molecular de Cría Caballar. Esto, además, aseguraba el reconocimiento internacional de los resultados.

Una vez planteada la iniciativa, se decidió plantear el estudio en dos etapas:

- Un primer estudio con un panel de cinco polimorfismos bioquímicos disponibles en el laboratorio.
- Un segundo estudio específico con un panel de 22 microsatélites recomendados por las instituciones internacionales.

Con los resultados obtenidos en el mencionado estudio, se obtuvo en primer lugar la descripción del perfil genético de la raza y en segundo lugar su caracterización definitiva a tres niveles: En el contexto español, en el contexto mundial y en el contexto Iberoamericano.

Empleando polimorfismos bioquímicos, se estudia la A1B-Glicoproteína, la Albúmina, la Cboxilesterasa, la proteína ligada a la Vitamina D y la Transferrina.

De cualquier forma, el caballo de las Retuertas de Doñana posee un alelo marcador en el locus de la Carboxilesterasa. Lo que quiere decir que, con la información disponible en la actualidad, todo animal que presente este alelo pertenece a la raza, pero, un animal que no lo posee no implica que no pertenezca. De cualquier forma la búsqueda de este alelo en las poblaciones criollas permitirá buscar argumentos para apoyar la idea de que los atesores del actual caballo de las Retuertas de Doñana acompañaron a Cristóbal Colón en su primer viaje a las Américas.

- *DISTANCIA DA NEI*

Así mismo, se calcula la matriz de la distancia mínima genética D_a de Nei (Nei, 1973)

$$D_m = (J_x + J_y) / 2 - J_{xy}$$

Donde J_x y J_y son la homocigosis promedio sobre *loci* en la población x e y respectivamente.

Para concluir el análisis estadístico de los resultados moleculares, se realizó uno de las pruebas más modernas y avanzadas para el análisis de las estructuras poblacionales de los animales incluidos en un determinado estudio. El programa *STRUCTURE* de Pritchard *et al.*, (2000) realiza agrupamientos paso a paso de los individuos estudiados, emitiendo en primer lugar la hipótesis de existencia de dos poblaciones, incrementando seguidamente el número de poblaciones hipotéticas hasta alcanzar el máximo de las preestablecidas, en este caso, 12.

La mayor parte de los sistemas proteicos estudiados muestran una distribución alélica común de sus variantes, de acuerdo con lo encontrado en el resto de razas estudiadas en el mismo laboratorio. Sin embargo, la carboxilesterasa muestra un comportamiento completamente anormal que llama mucho la atención:

En primer lugar, se observó que esta raza presentaba una cierta frecuencia del alelo “L”, el cual es muy raro en el Caballo Español y prácticamente no aparece en otras razas con excepción del caballo Berberisco. Esto apunta una relación ancestral del caballo de las Retuertas de Doñana con esta raza norteafricana, al igual que se ha apuntado con el Caballo Marismeño con información del ADN mitocondrial. Este aspecto fue publicado por Vega-Pla *et al.* (2005)

De todas formas, este apunte no deja de ser más que anecdótico, ya que “un locus no hace un genoma” y la influencia histórica de líneas maternas de caballo berberisco en las poblaciones situadas próximamente al estrecho era algo fácil de esperar teniendo en cuenta nuestra historia.

Más importante aún fue un segundo descubrimiento sobre el comportamiento de esta proteína en el caballo de las Retuertas de Doñana: Se encontró una nueva forma alélica de este marcador nunca descrita anteriormente. Este alelo se llamó provisionalmente alelo “K” y aparecía con una frecuencia de 0.16. En la Imagen 3 puede apreciarse su diferenciación electroforética. Esta información se incluyó en una amplia publicación en la que se abordaron también aspectos moleculares (Vega-Pla *et al.* 2006). Pero, previamente, se comprobó la inexistencia de referencias a este alelo a nivel mundial, lo cual fue confirmado por laboratorios como LABOGENA en Francia o VGL de la Universidad de Davis (USA).

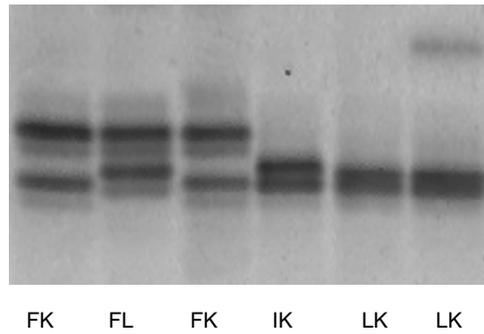


Imagen 3. Genotipos de la Carboxilesterasa correspondientes a seis caballos de las Retuertas de Doñana siguiendo la nomenclatura de ISAG. El alelo K detectado aquí se sitúa por debajo del alelo L en el resultado de la electroforesis.

De cualquier forma, es preciso indicar que la aparición de este nuevo alelo no deja de ser también anecdótica, ya que no indica nada más que en cualquier etapa de la historia de este caballo surgió una mutación de la Caboxilesterasa, que por cualquier razón incluida el azar, fue compatible con la adaptación de este animal a su ecosistema.

Se estudió, también, el comportamiento familiar de esta “nueva” caboxilesterasa, comprobando la existencia de una línea familiar bien demarcada, al menos en los animales que fueron estudiados. El pedigrí correspondiente se muestra en la Figura 1.

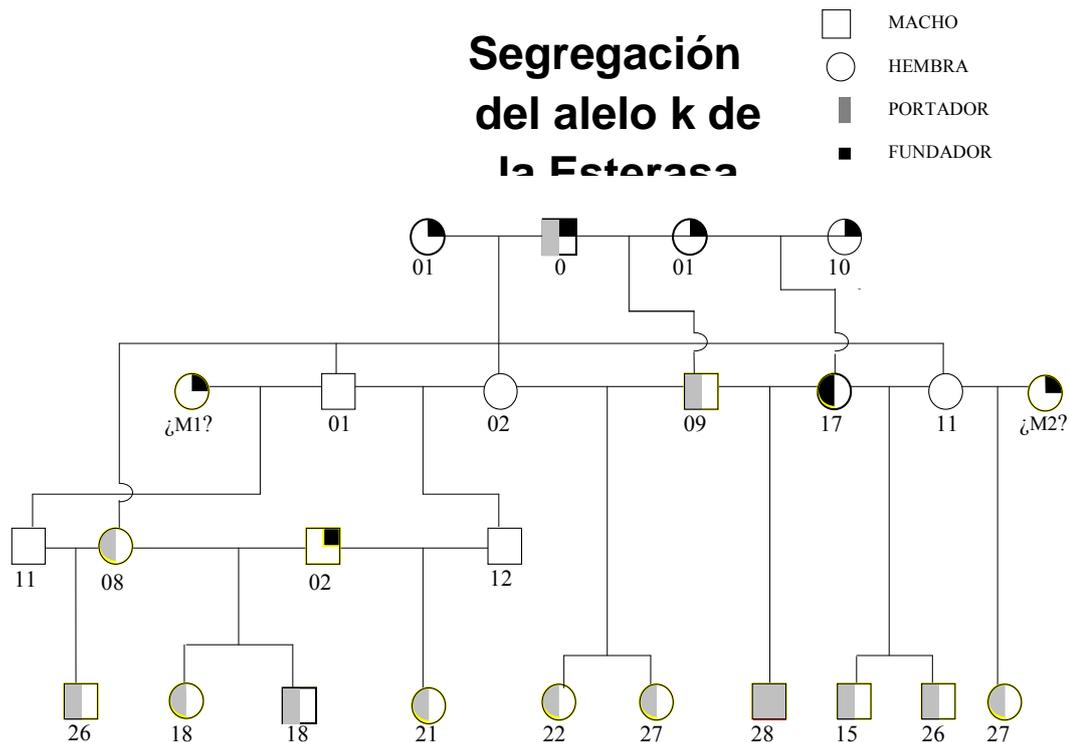


Figura 1: Pedigrí mostrando el recorrido del alelo “K” de la Caboxilesterasa en una familia de la población estudiada del caballo de las Retuertas de Doñana.

Este hallazgo estimuló a seguir las pautas recomendadas internacionalmente por instituciones del prestigio de *FAO* e *ISAG* para completar la caracterización de estos animales utilizando marcadores moleculares y más concretamente microsatélites.

En un estudio previo, el cual fue publicado en la revista *Animal Genetics* (Vega-Pla *et al.*, 2006), se comparó genéticamente al Caballo de las Retuertas con otras razas equinas.

Atendiendo al recuento del número de alelos, el cual es un indicador preliminar de los niveles de diversidad genética existente en la población estudiada, el Caballo de las Retuertas muestra claros indicios de aislamiento genético al mantener los niveles más bajos de todas las razas estudiadas. La comparación entre las heterocigosidades observada y esperada permite detectar efectos genéticos actuales sobre la población que alteran el equilibrio de Hardy-Weimberg, bien sea por exceso de heterocigotos, o bien por defecto. En el caso del Caballo de las Retuertas, se apreció un ligero exceso de heterocigotos, lo que se explica por la segmentación en tropas de la población con la consecuente formación natural de subpoblaciones aisladas reproductivamente y por el reciente cuello de botella que ha sufrido la población desde que permanece aislada en la Reserva Biológica de Doñana. El Fis es un indicador de la consanguinidad de la población y en este estudio previo se puede apreciar que, a pesar del pequeño tamaño real y efectivo de la población del Caballo de las Retuertas, la situación anteriormente descrita -donde se remarcaba la existencia de subgrupos- hace que la población tenga unos niveles de endogamia inferiores a lo que cabría esperar según su tamaño real y efectivo de la población. De cualquier modo, esta raza -por su pequeño y concentrado censo en un área muy restringida-, debe considerarse en un extremo peligro de extinción, sobre todo si se tiene en cuenta en adición la restricción al crecimiento de la población debido a las limitaciones de censos en el seno del Parque Nacional.

Tabla 2. Distancias genéticas D_a de Nei del caballo de las Retuertas con otras razas equinas

Población	N	Nº Alelos (SD)	H _z Inssegada (SD)	Obs H _z (SD)	FIS
RET	55	0,91 (1,06)	0,6857 (0,0194)	00,7255 (0,0129)	0,0587*
ARA	48	60,05 (1,50)	0,6725 (0,0245)	00,6353 (0,0148)	0,0559*
AST	39	70,18 (1,74)	0,7361 (0,0195)	00,7584 (0,0146)	0,0307
SPB	60	70,77 (1,34)	0,7522 (0,0171)	00,7477 (0,0120)	0,0060
ING	46	50,73 (1,08)	0,7350 (0,0128)	00,7418 (0,0138)	0,0093
LOS	59	80,27 (1,52)	0,7444 (0,0169)	00,7522 (0,0120)	0,0105

N = Tamaño de la muestra, *Nº Alelos* = Número de Alelos, diversidad genética y desviación estándar **entre** paréntesis, *H_z* = heterocigosidad observada y desviación estándar, y finalmente, *FIS* = coeficiente de consanguinidad (*Valores significativos por exceso o por defecto $P < 0.05$). (RET. Retuertas; ARA. Árabe, AST. Asturcón, SPB. Español, ING. Inglés, LOS. Losino, MAL. Mallorquín, MAR. Marismeño, MEN. Menorquín. POT. Pottoka, TRO Trotador Español)

En la Tabla 2 se presentan los resultados del análisis de distancias genéticas D_a de Nei. En los cuales puede apreciarse cómo el caballo de las Retuertas de Doñana es, con claridad, la raza mejor

diferenciada de todas las estudiadas. Ha de tenerse en cuenta que se han incluido todas las razas que pudieran estar en su contexto: el Español y Marismeño (por el contexto geográfico y evolutivo), el Asturcón, Losino, Pottoka, Mallorquín y Menorquín (por introducir una representación del contexto nacional incluyendo caballos de origen Celta), el Inglés, el Árabe (como razas de referencia internacional). Finalmente, el Trotón y el asno (para introducir grupos de referencia de la especie y del grupo taxonómico que nos permitiera dimensionar con claridad las distancias entre razas).

En la Tabla 3 se observa cómo la pertenencia del Pura Raza Española, Marismeño y Retuertas a un tronco común queda evidenciada, éste es el Tronco "Ibérico" al que se hacía referencia en los primeros párrafos. Sin duda, la Pura Raza Española es la raza más evolucionada debido al proceso selectivo que ha sufrido. Por otra parte, el Marismeño, es una raza muy diversa en la que han influido recientemente distintas razas y, además, ha recibido la influencia reciente del actual caballo de Pura Raza Española, lo que se aprecia por la reducidísima distancia encontrada entre ellos.

En esta misma tabla se puede apreciar que la diferenciación entre el Caballo de las Retuertas y los otros miembros de su grupo es proporcional a la que presentan los integrantes del grupo Celta entre sí, por tanto desde el punto de vista genético, el caballo de las Retuertas de Doñana presenta una diferenciación suficiente para ser considerado una raza diferenciada incluso con respecto a poblaciones como el Español y el Marismeño, con los que comparte pasado.

Tabla 3. Distancias Genéticas Da estimadas entre las once poblaciones estudiadas

	RET	ARA	AST	PRE	PSI	LOS	MAL	MAR	MEN	POT	TRO	ASN
RET												
ARA	0,159											
AST	0,124	0,212										
PRE	0,098	0,185	0,171									
PSI	0,177	0,226	0,270	0,204								
LOS	0,115	0,219	0,140	0,148	0,268							
MAL	0,131	0,267	0,218	0,188	0,263	0,222						
MAR	0,077	0,170	0,161	0,063	0,181	0,139	0,170					
MEN	0,127	0,239	0,207	0,164	0,270	0,156	0,176	0,162				
POT	0,128	0,224	0,158	0,146	0,248	0,110	0,199	0,144	0,168			
TRO	0,273	0,200	0,203	0,141	0,162	0,180	0,180	0,134	0,164	0,149		
ASN	0,423	0,470	0,396	0,374	0,409	0,380	0,427	0,368	0,394	0,392	0,393	

RET=Retuertas, ARA=Árabe, AST=Asturcón, PRE=Pura Raza Española, PSI= Pura Sangre Inglés, LOS=Losino, MAL=Mallorquín, MAR=Marismeño, MEN=Menorquín, POT=Pottoka, TRO=Trotón Español, ASN=Asno

Atendiendo a los resultados con los índices de fijación (Tabla 4) por pares de razas, se puede observar que, bajo los modelos de infinitos alelos y de Slatkin, los resultados obtenidos con las distancias

genéticas se ven corroborados. Es decir, se confirma aun con mayor profundidad que el caballo de las Retuertas mantiene una posición muy bien definida dentro del contexto racial de la especie equina.

Tabla 4. Índices de Fijación por pares de poblaciones para las poblaciones estudiadas

	RET	ARA	AST	PRE	PSI	LOS	MAL	MAR	MEN	POT	TRO	ASN
RET		0,15	0,11	0,09	0,16	0,11	0,12	0,07	0,12	0,11	0,19	0,36
ÁRA	0,16		0,08	0,10	0,12	0,09	0,10	0,07	0,05	0,06	0,09	0,38
AST	0,17	0,11		0,11	0,19	0,04	0,10	0,08	0,04	0,05	0,12	0,33
PRE	0,11	0,11	0,08		0,10	0,07	0,08	0,02	0,03	0,09	0,13	0,31
PSI	0,18	0,12	0,12	0,10		0,14	0,12	0,08	0,13	0,13	0,07	0,34
LOS	0,16	0,06	0,06	0,07	0,12		0,07	0,08	0,00	0,05	0,08	0,32
MAL	0,16	0,13	0,09	0,08	0,12	0,09		0,06	0,07	0,09	0,11	0,35
MAR	0,07	0,08	0,05	0,02	0,07	0,04	0,06		0,06	0,05	0,10	0,31
MEN	0,15	0,12	0,08	0,06	0,12	0,07	0,07	0,05		0,06	0,08	0,32
POT	0,16	0,12	0,06	0,06	0,09	0,04	0,07	0,04	0,04		0,07	0,33
TRO	0,13	0,11	0,09	0,07	0,07	0,08	0,08	0,05	0,05	0,06		0,33
AS	0,79	0,79	0,77	0,78	0,78	0,78	0,79	0,74	0,74	0,74	0,76	

Por encima de la diagonal se presentan los resultados según el modelo de infinitos alelos y debajo con el estimador insesgado de Slatkin R_{st} . RET=Retuertas, ARA=Árabe, AST=Asturcón, PRE=Pura Raza Española, PSI= Pura Sangre Inglés, LOS=Losino, MAL=Mallorquín, MAR=Marismeño, MEN=Menorquín, POT=Pottoka, TRO=Trotón Español, ASN=Asno

En la Figura 2, se manifiesta la excelente definición de los caballos de las Retuertas de Doñana con respecto al resto de las razas estudiadas en los resultados de un análisis multivariante Factorial de Correspondencia, teniendo en cuenta la información molecular de los marcadores estudiados. La representación gráfica se realiza teniendo en cuenta las dos primeras variables canónicas, y en ella puede observarse cómo el caballo de las Retuertas de Doñana forma un agrupamiento completamente independiente del resto de la especie. En este análisis se eliminó a los asnos ya que su introducción reduciría la distribución espacial de los resultados.

Esto hace presumir una posición filogenética muy ancestral y resalta el interés biológico del caballo de las Retuertas de Doñana.

En la Figura 2 resulta sorprendente la nítida separación de la práctica totalidad de los Caballos de las Retuertas respecto de los del resto de las razas estudiadas, que aparecen agrupados al margen de una forma muy bien definida.

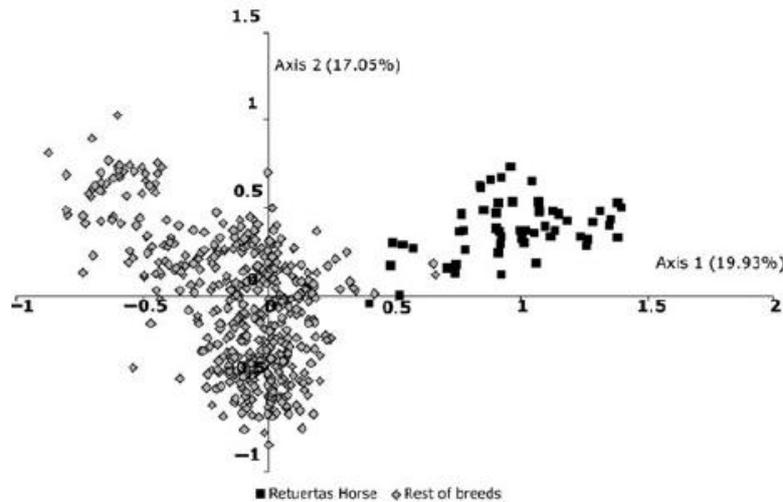


Figura 2. Proyección sobre los dos ejes que absorben la máxima variabilidad, en un análisis multifactorial, de los ejemplares de las once razas de caballos consideradas (Vega-Pla et al., 2006)

En la Figura 3 se presenta un árbol filogenético de relación (Neighbour Joining Tree) construido con las distancias genéticas D_a de Nei. Esta vez sí se mantuvieron a los asnos ya que este método permite fijar la raíz filogenética del árbol construido. También es de destacar la alta precisión de los resultados demostrada con los valores de bootstraps: En todos los casos muy altos, con la excepción de la diferenciación de los clústeres formados por los caballos Celtas y los Baleares.

Los resultados apoyan lo visto en el análisis factorial de correspondencia, ya que el caballo de las Retuertas de Doñana se muestra también aquí como una raza perfectamente diferenciada, en un análisis que se muestra concordante con el conocimiento histórico y evolutivo de las razas implicadas. Destacar en este sentido, la relación conocida entre los trotones y el Pura Sangre Inglés; el agrupamiento de las tres razas de origen Celta; del mismo modo que ambas razas Baleares. Destaca aquí la altísima proximidad entre el Marismeño y el Pura Raza Española que apunta influencias recientes entre ambas más allá de un origen común.

En todo caso, el Retuertas de Doñana no solo se muestra en todos estos estudios como una raza diferenciada, sino que su aislamiento y asilvestramiento ha podido traer hasta la actualidad una raza ancestral escasamente evolucionada bajo criterios artificiales que guardarían una relación directa con los ancestros de los caballos Ibéricos que tan altamente fueron reconocidos por civilizaciones como la Romana y la Árabe.

ANÁLISIS DEMOGRÁFICO Y CARACTERIZACIÓN SEMINAL DEL CABALLO DE LAS RETUERTAS DE DOÑANA

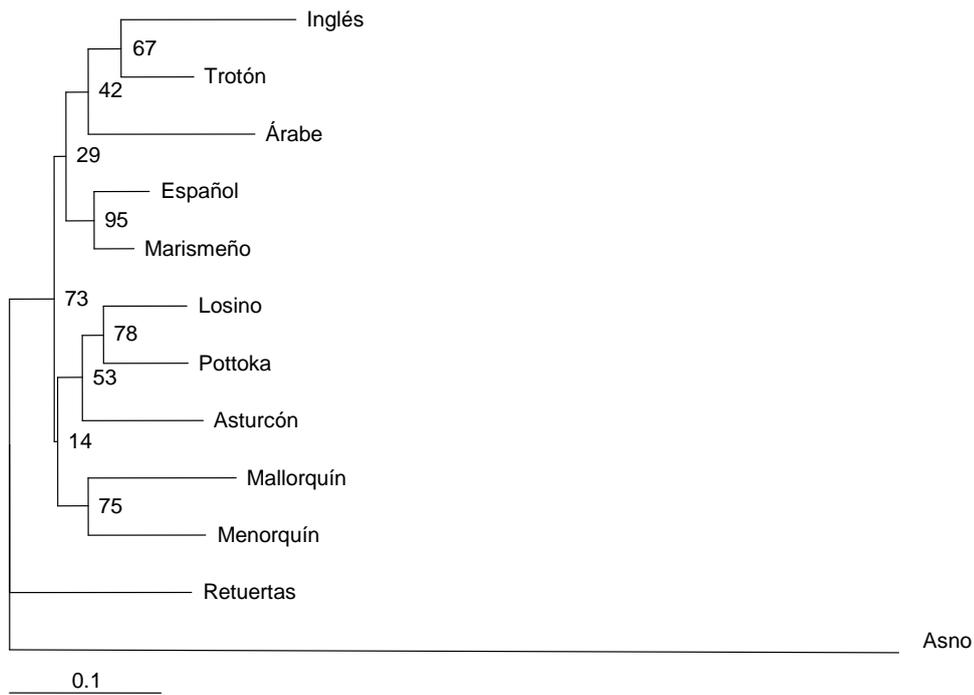


Figura 3. Árbol de relación (Neighbour-Joining Tree) construido con las distancias D_a para las once poblaciones en estudio, incluyendo los asnos. El número en los entronques de las razas representan el porcentaje sobre 1000 iteraciones entre loci.

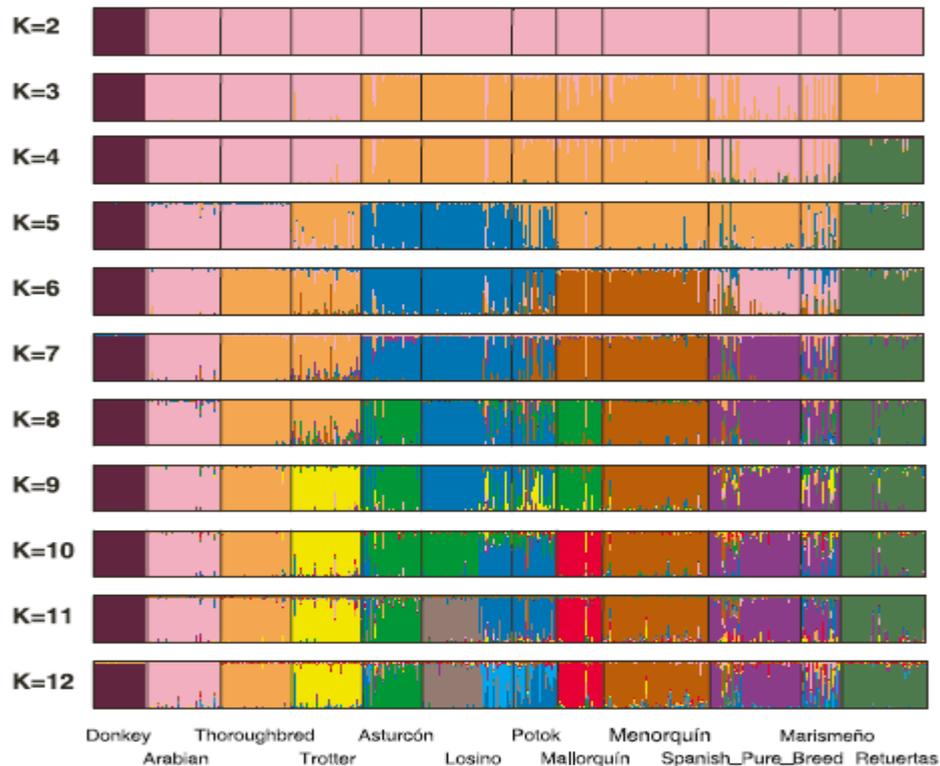


Imagen 4. Sucesivos agrupamientos realizados por el programa “Structure” de las once razas de caballos analizadas, y el asno, atendiendo a sus características genéticas (Vega-Pla et al., 2006)

En la imagen 4 se muestran los sucesivos agrupamientos que realiza el programa informático “Structure” (Pritchard et al., 2000) utilizando los datos genéticos de cada uno de los individuos de las doce poblaciones analizadas, incluyendo el asno. Los cálculos se realizaron aplicando un enfoque bayesiano y utilizando técnicas MCMC (Monte Carlo Markow Chain), Este programa agrupa a los animales que tienen más probabilidad de pertenecer a una misma población ancestral, Cuando se consideran dos poblaciones ancestrales (K=2), se separa el asno de todos los caballos. Al realizar tres grupos (K=3), se separan por un lado los individuos de las razas Árabe, Inglés, Trotador Español, Pura Raza Española y Marismeño. Y por otro, los de las razas de origen centroeuropeo (Asturcón, Losino y Pottoka), incluyéndose entre estos últimos los Mallorquines, Menorquines y los Caballos de las Retuertas.

El siguiente paso (4 poblaciones ancestrales: K=4) deja ya a todos los ejemplares de Caballo de las Retuertas juntos, con una entidad propia, siendo los primeros que se individualizan como población ancestral. Las demás razas de caballos siguen formando dos grupos, que se van separando progresivamente de la manera esperada, según se le va pidiendo al programa que vaya haciendo más grupos (entre K=5 y K=12).

Sería interesante continuar este trabajo estudiando el papel preponderante de los antecesores del caballo de las Retuertas de Doñana en la formación de las razas criollas Iberoamericanas. En tal sentido, ya existen datos preliminares, incluyendo algunas razas americanas de origen ibérico en un estudio reciente (Vega-Pla et al., 2005) como fueron el caballo Criollo Cubano y las razas brasileñas Mangalarga, Pantaneiro y Marajoara.

2.5 FACTORES QUE CONDICIONAN LA VIABILIDAD EN POBLACIONES EQUINAS DE PEQUEÑO TAMAÑO

2.5.1 Endogamia y tamaño efectivo

Uno de los principales problemas de las razas en peligro de extinción es la alta consanguinidad debido a los apareamientos entre individuos emparentados (Miró-Arias, León *et al.*, 2012). Esta consanguinidad puede provocar una depresión inmunológica debido a la disminución de la variabilidad genética que lleva a un aumento de la vulnerabilidad a enfermedades y otras patologías ((Acevedo-Whitehouse). Además, se ha demostrado en distintas especies que una alta consanguinidad está relacionada con un efecto negativo en la fertilidad y calidad seminal (Roldan, Gomendio *et al.*, 2006; van Eldik, van der Waaij *et al.*, 2006). Estos fenómenos pueden ser explicados por el incremento de homocigosis, la cual, provoca un aumento de la probabilidad de expresión de genes recesivos letales o subletales.

La endogamia o consanguinidad (F) se define como la probabilidad de que un individuo tenga dos alelos idénticos por descendencia, y ha sido calculada según Meuwissen y Luo (1992). El aumento de la consanguinidad (ΔF) se calcula para cada generación por medio de la fórmula clásica:

$$\Delta F = \frac{F_t - F_{t-1}}{1 - F_{t-1}}$$

Donde F_t y F_{t-1} son la endogamia promedio de la generación i . Teniendo $F_t > F_{t-1}$ que caracterizar, aproximadamente, el efecto de la endogamia lejana y próxima.

Usando ΔF , se calcula el tamaño efectivo de la población (N_e) para cada generación como:

$$N_e = \frac{1}{2\Delta F}$$

Teniendo $F_t > F_{t-1}$ que caracterizar, aproximadamente, el efecto de la endogamia lejana y próxima.

N_e se define como el número de animales reproductores que participarían en el incremento real de la consanguinidad si contribuyeran igualmente a la siguiente generación. En poblaciones pequeñas con pedigrís escasos, independientemente del método utilizado para calcular N_e , este parámetro se ajusta pobremente con las poblaciones reales, dando una sobreestimación de la población real efectiva (Goyache *et al.*, 2003). Para caracterizar mejor estas pequeñas poblaciones, se han dado

tres valores adicionales de N_e calculando el coeficiente de regresión (b) del coeficiente de consanguinidad individual sobre:

- El número de generaciones completas trazadas
- El número máximo de generaciones trazadas
- Las generaciones equivalentes completas

Y teniendo en cuenta el coeficiente de regresión correspondiente como el aumento de la consanguinidad entre dos generaciones:

$$(F_t \text{ y } F_{t-1} = b)$$

Y por lo tanto,

$$N_e = \frac{1}{2b}$$

Es posible calcular ΔF para una subpoblación de referencia determinada, utilizando diferentes enfoques basados en regresión. En primer lugar, se calcula el incremento de la consanguinidad como:

$$\Delta F = \frac{F_t - F_{t-1}}{1 - F_{t-1}} \approx \frac{b}{1 - (F_{t-b})}$$

Siendo F_t la F media de la subpoblación de referencia y b , el coeficiente de regresión de los coeficientes de consanguinidad individuales a lo largo de las generaciones completas equivalentes.

Además, el tamaño efectivo se calcula, siguiendo a Gutiérrez *et al.* (2003), a partir del coeficiente de regresión (b) de los coeficientes de endogamia durante el año de nacimiento en la población de referencia y calculando el aumento de la consanguinidad entre dos generaciones como:

$$F_t - F_{t-1} = l \times b$$

Donde l es el intervalo promedio de generación y F_t es la consanguinidad media de la subpoblación de referencia. Finalmente, es posible calcular el enfoque por Pérez-Enciso (1995) para estimar N_e a través de una regresión log de $(1 - F_t)$ sobre el número de generación, donde F_t es obtenido de:

$$F_t = 1 - (1 - \Delta F) \text{ siendo } 1 - F_t = \left(1 - \frac{1}{2N_e}\right)$$

Cuando los conjuntos de datos sin generaciones discretas son analizados, N_e se puede calcular mediante una regresión log de $(1 - F_t)$ en la fecha de nacimiento y, luego, dividido por el intervalo de generación (Pérez-Enciso, 1995).

2.5.2 *Deriva genética*

Es definida como los cambios aleatorios de las frecuencias alélicas, que desencadenan una disminución de la variabilidad genética. Estos cambios pueden derivar en una fijación o pérdida de determinados caracteres. La deriva genética puede tener efectos a dos niveles:

- Contribución diferencial de los progenitores a la descendencia: si existen individuos portadores de una información exclusiva y no se reproducen, la información se pierde para siempre.
- Contribución de los gametos a la descendencia: En individuos heterocigotos, por probabilidad, se difunde un tipo de alelo y el otro no se transmite.

Estos procesos son impredecibles porque son aleatorios, pero afectan en igual medida que los procesos selectivos a la diversidad genética.

2.5.3 *Depresión exogámica*

Consiste en una disminución de la adaptación al medio ocasionada por la mezcla de poblaciones muy distantes. En estos cruces, es posible que no se transmitan los llamados genes coadaptados, que son un grupo de alelos cuyo efecto conjunto implica una mayor eficacia biológica en un determinado ambiente.

2.5.4 *Fragmentación de la población*

Ocasiona poblaciones divididas o metapoblaciones y son producto de una gestión independiente sin la suficiente conexión genética.

2.5.5 *Coefficiente de relación promedio (AR)*

El coeficiente de relación promedio de cada individuo se define como la probabilidad de que un alelo elegido al azar de toda la población perteneciente al libro genealógico, pertenezca a un animal determinado.

AR puede ser interpretado como la representación de los animales en el pedigrí total, independientemente del conocimiento de su propio pedigrí.

Las ventajas de utilizar *AR* son:

- El coste computacional para calcular coeficientes de *AR* es similar al empleado para el cálculo de la matriz de relación, ya que ambos utilizan algoritmos comunes.
- *AR* de un fundador indica su contribución genética a la población.
- Los coeficientes de *AR* también se pueden utilizar como una medida de endogamia de la población, ya que tiene en cuenta tanto la endogamia como coeficientes de coascendencia.
- *AR* se puede utilizar como un índice para mantener la reserva genética inicial. Así, se deben usar como animales reproductores aquellos con el menor valor *AR*.
- *AR*, como complemento o alternativa a *F*, se puede utilizar para predecir la endogamia a largo plazo de una población ya que tiene en cuenta el porcentaje de la genealogía completa procedente de una población fundadora. Además, *AR* puede ser utilizado para calcular el tamaño efectivo de la población fundadora como la inversa de la suma de los cuadrados de los coeficientes de *AR* a través de animales fundadores.

2.5.6 Nivel de reconstrucción del pedigrí

Consiste en el cálculo, según los datos de la genealogía, para cada individuo, de:

- Número de generaciones trazadas totalmente: se define como la separación de los hijos de la generación más lejana donde los dos antepasados del individuo son conocidos. Los antepasados sin padre conocido son considerados como fundadores (generación 0).
- Número máximo de generaciones trazadas: es el número de generaciones que separan al individuo de su antepasado más lejano.
- Generaciones equivalentes completas: se calculan como la suma de todos los antepasados conocidos, $(1/2)n$, donde n es el número de generaciones que separan al individuo de cada antepasado conocido (Maignel *et al.*, 1996)

2.5.7 Selección de los ancestros

Permite evaluar la contención del origen de los animales y los genes mediante el cálculo de los parámetros siguientes (Boichard *et al.*, 1997):

1. Número efectivo de fundadores (f_e): se define como el número de fundadores contribuyendo igualmente que se podría esperar para producir la misma diversidad genética como en la población en estudio.

$$f_e = 1 / \sum_{k=1}^f q_k^2$$

Donde q_k es la probabilidad de que un gen provenga del ancestro k

2. Número efectivo de ancestros (f_a): Es el número mínimo de antepasados, no necesariamente fundadores, que explican la diversidad genética completa de una población. Este parámetro complementa la información ofrecida por el número efectivo de fundadores que representan la pérdida de variabilidad genética producida por el uso desequilibrado de individuos reproductivos que producen cuellos de botella. Este parámetro se calcula de manera similar al número efectivo de fundadores:

$$f_a = 1 / \sum_{j=1}^a q_j^2$$

Donde q_j es la contribución marginal de un ancestro j , la cual es la contribución genética hecha por un ancestro que no es explicada por otros antepasados elegidos antes: los dos últimos parámetros se calculan inicialmente tomado como población de referencia a los animales en el libro genealógico con los dos padres conocidos.

2.5.8 *Índice de conservación genética (GCI)*

Este índice se calcula para cada uno de los individuos de la población analizada, a partir de las contribuciones genéticas de todos los fundadores identificados como:

$$GCI = \frac{1}{\sum p_i^2}$$

Donde p_i es la proporción de genes del fundador i en el pedigrí de un animal. Este índice se basa en la suposición de que el objetivo de un programa de conservación es conservar toda la gama de alelos que posee la población base. En este sentido, el individuo ideal debería recibir contribuciones iguales de todos los ancestros fundadores en la población y, en consecuencia, cuanto mayor es el valor GCI, más alto es el interés por un animal para su conservación.

2.5.9 *Intervalos generacionales*

A nivel de población o subpoblación, es posible computar tanto los intervalos generacionales (promedio de edad de los padres al nacimiento de la progenie que será mantenida para reproducción) como la edad promedio de los padres en el nacimiento de sus hijos empleados para reproducción o no, Ambos parámetros se calculan para las cuatro vías:

- Padre-hijo
- Padre-hija
- Madre-hijo
- Madre-hija

2.6 *LAS TECNOLOGÍAS REPRODUCTIVAS Y LOS PROGRAMAS DE CONSERVACIÓN*

Los programas de conservación necesitan la ayuda de técnicas de la reproducción asistida (criopreservación de gametos, inseminación artificial, transferencia de embriones, fecundación in vitro, etc.), ya que éstas permiten el crecimiento poblacional de especies domésticas o salvajes dispersadas geográficamente y en vías de desaparición. La utilidad de las técnicas de reproducción asistida en el contexto de especies en peligro de extinción reside en el hecho de poder facilitar el manejo genético de poblaciones naturales y de los programas de cría en cautividad. Las especies amenazadas constituyen, con frecuencia, poblaciones pequeñas y aisladas, en las que hay falta de flujo genético; además, cuentan, en general, con pocos individuos fundadores, siendo frecuentes los cruces entre individuos emparentados.

Estos métodos son el mejor medio para aumentar la descendencia a partir de progenitores seleccionados evitando la consanguinidad; pues, en poblaciones pequeñas o aisladas en las que los intercambios genéticos no existen o son escasos, se podría originar un incremento de la consanguinidad, con el aumento de aparición de problemas congénitos. Por otra parte, el uso de técnicas reproductivas es muy eficaz para poner en marcha programas de conservación y mejora genética, ya que se puede disminuir los intervalos generacionales.

La aplicación de técnicas reproductivas en las especies en peligro se ve limitada por diferentes factores, entre los que merece la pena mencionar: fisiología reproductiva, material biológico escaso y de mala calidad y sensibilidad al estrés (Comizzoli *et al.*, 2000).

2.7 ESPERMATOZOIDE Y PLASMA SEMINAL

El espermatozoide es una célula terminal, cuyo rol principal es el transporte de un paquete - constituido por el genoma nuclear y el centriolo-, hasta el ovocito. Para realizar esta tarea, el espermatozoide está equipado con una batería de estructuras especializadas (una membrana plasmática que muestra áreas delimitadas, orgánulos con disposición específica tales como la vaina mitocondrial, y especializaciones de los mismos tales como el flagelo y el acrosoma) que garantizan la interacción particular con el tracto genital femenino y el ovocito y sus envolturas.

La fracción líquida, de las secreciones que se forman durante la eyaculación, se conoce como plasma seminal. El principal componente del plasma seminal es el agua (75%), aunque también aparecen sustancias, tanto orgánicas como inorgánicas, que sirven de protectores nutricionales de los espermatozoides (Salamon y Maxwell, 2000).

El efecto del plasma seminal sobre la motilidad de los espermatozoides, su capacidad de supervivencia y la resistencia a los cambios producidos durante el proceso de preservación, han sido estudiado en distintas especies aunque su función aún no se comprende totalmente.

Los espermatozoides se forman dentro de los túbulos seminíferos de los testículos. Éstos contienen una compleja serie de células germinales en desarrollo que, finalmente, constituirán los gametos masculinos, altamente especializados (Hafez y Hafez, 2000). Los espermatozoides maduros son células alargadas consistentes en una cabeza aplanada portadora del núcleo y una cola que contiene las estructuras necesarias que permiten su movilidad. El espermatozoide entero está cubierto por la membrana plasmática.

El acrosoma o casquete acrosómico, es una estructura de doble pared situada entre la membrana plasmática y la porción anterior de la cabeza del espermatozoide.

2.8 VALORACIÓN DE LA CALIDAD ESPERMÁTICA

La valoración de la calidad del esperma se emplea, habitualmente, como método predictivo de los parámetros que caracterizan la viabilidad de la célula espermática y de la fertilidad del macho (Gadea-Mateo, 1997; Colenbrander *et al.*, 2003, citado por Hidalgo, 2004). Aunque el mejor sistema para determinarlo sería estimar el porcentaje de gestación que se obtiene tras inseminar un determinado número de hembras, normalmente se recurre a la evaluación en condiciones de laboratorio de una serie de parámetros relacionados con la fertilidad.

El análisis diagnóstico del semen de equino, requiere la obtención máxima de información mediante el examen de unos o varios eyaculados. Tradicionalmente, el estudio de la calidad del esperma se viene desarrollando a través de una serie de parámetros macro y microscópicos que se integran en una prueba de valoración *in vitro*. A pesar de que la correlación entre estos parámetros y la fertilidad no es definitiva, sí que ofrece información válida acerca de la calidad seminal; ya que, si bien una muestra de buena calidad no siempre es fértil, una de baja calidad rara vez lo será (Hidalgo, 2003).

- **COLOR**

El color del semen es el primer factor a valorar y debe realizarse en el mismo tubo colector, inmediato a la obtención. Un semen de buena calidad presenta un color blanco lechoso a un tanto cremoso, y relativamente uniforme, indicativo de alta concentración, (Bhattacharyya *et al.*, 2009).

- **VOLUMEN**

El volumen de los eyaculados de equinos es un parámetro que presenta una baja repetitividad, ya que éste depende de la edad y condición del animal, factores ambientales y destreza del operario. El volumen de cada eyaculado disminuye con las frecuencias de recogida a lo largo de cada extracción (Hafez y Hafez, 2000). El método comúnmente utilizado para medir el volumen, es directamente en el tubo de recogida calibrado en milímetros.

- **MOTILIDAD**

La motilidad ha sido uno de los parámetros de la calidad seminal más estudiados en el espermatozoide, al ser ésta una de las más importantes expresiones de la función espermática, que según algunos autores, puede ser uno de los factores que mejor se correlacionan con la fertilidad (Shanis *et al.*, 1989).

La motilidad se valora mediante las características del movimiento del semen. La valoración por la onda de movimiento es el sistema más simple para determinar la motilidad del semen fresco. La evaluación de la motilidad se realiza con semen puro (motilidad masal), o por el contrario, tras ser diluido o congelado-descongelado se analiza la proporción de espermatozoides progresivos, conocida como motilidad progresiva (Hafez y Hafez, 2000). La motilidad masal, que es únicamente evaluable en eyaculaciones de mamíferos con concentraciones espermáticas muy elevadas, como es el caso de los equinos, se determina depositando una gota de la muestra seminal sin diluir sobre un porta-objetos atemperado en una placa térmica, y se visualiza sobre la muestra en un microscopio óptico a 10x. Se evalúa de forma subjetiva el movimiento de las células espermáticas en su conjunto, y se les da una valoración del 0 al 5.

- **Motilidad progresiva**

El método tradicional para determinar la motilidad progresiva consiste en utilizar una gota de semen que se deposita entre un porta y un cubre para evaluar el movimiento de los espermatozoides, generando así una película fina que permita determinar de forma más o menos precisa, el número de células móviles presentes en la muestra, e incluso realizar una valoración de si el tipo de movimiento observado es normal o no. Se observan varios campos por muestra utilizando para ello un microscopio óptico a 40x, La estimación de dicho parámetro está dada en una escala de 0-100%.

La motilidad puede verse alterada tanto por una inadecuada temperatura como por la presencia de sustancias tóxicas en el equipo de recolección (Álamo-Santana, 2007).

Para algunos autores, la motilidad espermática es uno de los parámetros para conocer tanto la calidad seminal como la correlación con la fertilidad. Sin embargo, los resultados están limitados tanto por la subjetividad de la prueba como por la elevada sensibilidad de la variable a la manipulación. Hasta nuestros días, la motilidad se ha venido desarrollando de forma subjetiva mediante la observación al microscopio de los porcentajes de células móviles.

Actualmente, el análisis seminal clásico ha mejorado mediante la introducción de nuevas técnicas analíticas procedentes de otros campos de la investigación científica. Así, cada vez más autores están utilizando el sistema CASA (*Computerized Assisted Sperm Analysis*) para obtener un valor preciso y objetivo de la motilidad espermática y de la calidad del movimiento de los espermatozoides presentes en la muestra, La incorporación de estos métodos informáticos atenúa en gran parte el factor subjetivo del análisis seminal, y garantiza una mejor correlación con la capacidad fecundante del espermatozoide.

Este sistema ha provisto de interesantes resultados sobre los porcentajes medios de motilidad y las diferentes subpoblaciones de espermatozoides que coexisten en una misma muestra (Ticiano *et al.*, 2010). Esta técnica es posible utilizarla tanto en semen fresco como en el congelado o refrigerado.

Tras todo lo dicho, cabe destacar que hasta el momento no se ha conseguido un método de evaluación seminal *in vitro*, que al utilizarlo sólo o en combinación con otros sea capaz de predecir de forma segura la capacidad fecundante de una muestra de semen. Para Hidalgo Ordóñez *et al.*, (2005), la valoración *in vitro* de la calidad seminal es muy importante en la valoración andrológica de los machos, ya que es el mejor indicador del grado de conservación del semen congelado-descongelado.

- *Valoración de la motilidad espermática mediante el sistema informatizado CASA*

El análisis computerizado de la motilidad fue propuesto por primera vez por Dott y Foster (1979). Desde que se introdujo en el mercado al principio de los años 80, originalmente para la evaluación del semen humano, este tipo de análisis se ha ido perfeccionando y modernizando, a la vez que fue haciéndose más accesible y; por consiguiente, comenzó a utilizarse en el campo de la ciencia animal, especialmente en centros de inseminación e investigación.

Los sistemas CASA están completamente infrutilizados; pues, suelen usarse tan sólo para reproducir la observación subjetiva tradicional, (Soler *et al.*, 2008). Aun así, aportan un menor error técnico y en muchos casos un ahorro de tiempo importante. Pero la mayor parte de informes que aportan se limitan al porcentaje de espermias móviles o móviles progresivos, células de morfología normal y concentración, ignorando, así, los parámetros más importantes que son los datos individuales de cada célula; pues, a partir de los mismo, se puede hacer una valoración real de la población espermática. Con las trayectorias se calculan, tradicionalmente, una serie de parámetros, tal como lo presenta la Figura 4, donde se representan la trayectoria correspondiente a VCL (velocidad curvilínea), la VSL (velocidad lineal) y la trayectoria corresponde a la VAP (velocidad media).

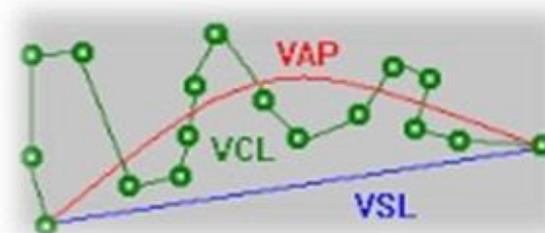


Figura 4. Representación gráfica de las trayectorias de los parámetros cinéticos espermáticos. VCL (Velocidad Curvilínea), VSL (Velocidad Rectilínea) y VAP (Velocidad Media)

El análisis se hace al capturar las imágenes de espermatozoides en movimiento, previamente diluidos en un medio adecuado y en el microscopio a 100-200 aumentos. Tras la captura, la información es guardada hasta su análisis. Una vez realizado el análisis, la información obtenida es transferida a un procesador matemático que fragmenta la motilidad espermática en diversos descriptores de la

motilidad individual que caracterizan la linealidad, la angularidad del movimiento espermático y el desplazamiento de la cabeza del espermatozoide.

De manera general, estos sistemas constan de tres componentes principales: un microscopio con contraste de fase conectado a una pletina atemperada que permite mantener las muestras a 37°C, una cámara de vídeo de alta resolución conectada a una pantalla de televisión y un software de análisis de imágenes por ordenador.

- *Cuantificación de los movimientos espermáticos*

Los valores cinemáticos determinados para cada espermatozoide cubren la velocidad de circulación, la anchura de la trayectoria de la cabeza del espermatozoide, y la frecuencia del cambio de dirección de la cabeza del espermatozoide (Mortimer, 2000). Algunos de los parámetros más utilizados por diversos autores son los porcentajes de motilidad total o motilidad progresiva.

En función de su progresividad, los espermatozoides son clasificados en: estáticos, móviles progresivos y móviles no progresivos.

En función de su velocidad, llámese curvilínea (*VCL*), velocidad lineal (*VSL*), velocidad media (*VAP*), se clasifican en: rápidos, medios y lentos.

Según sus índices de linealidad, rectitud, oscilación se clasifican en: rápidos, medios y lentos.

Los parámetros de velocidad que se determinan según Mortimer (1997), son los siguientes:

- Velocidad Curvilínea (*VCL*): Distancia total recorrida por la cabeza del espermatozoide a lo largo de su trayectoria real por unidad de tiempo ($\mu\text{m/s}$).

- Velocidad Rectilínea (*VSL*): Se determina a partir de la distancia en línea recta entre el primer y último punto de su trayectoria, y da la ganancia de espacio neto en el período de observación, medida en unidad de tiempo ($\mu\text{m/s}$).

- Velocidad Media (*VAP*): Distancia recorrida por el espermatozoide a lo largo de la trayectoria media de circulación en el periodo de observación. Esto es, conceptualmente, el valor de la velocidad más difícil de entender porque podría parecer que debería ser similar a la *VSL*.

Debido a la forma en que la trayectoria influye en los valores de velocidad, estos son también comparables, Los índices de estas tres velocidades son:

- Índice de linealidad (*LIN*): Es la relación porcentual entre la velocidad rectilínea y la velocidad curvilínea.

$$\text{LIN} = (\text{VSL}/\text{VCL}) \times 100.$$

- Índice de rectitud (*STR*): Es la relación porcentual entre la velocidad rectilínea y la velocidad media.

$$\text{STR} = (\text{VSL}/\text{VAP}) \times 100.$$

- Índice de oscilación (*WOB*): Es la relación porcentual entre la velocidad media y la velocidad rectilínea.

$$\mathbf{WOB = (VAP/VCL) \times 100.}$$

Con todos estos valores queda caracterizada la calidad del movimiento espermático.

- **VALORACIÓN DE LA VIABILIDAD ESPERMÁTICA MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO**

En las últimas dos décadas, la citometría de flujo se ha convertido en una técnica importante gran utilidad en la evaluación espermática y es cada vez más utilizada tanto para la evaluación de rutina como para la investigación en ciencia veterinaria (Martínez-Pastor *et al.*, 2010). Se han desarrollado muchos métodos de tinción y combinación de fluorocromos que permiten analizar una gran variedad de funciones espermáticas. Entre las características espermáticas más comúnmente analizadas para el control de la calidad del semen equino, se incluyen el estudio de la viabilidad espermática, integridad del acrosoma, la funcionalidad mitocondrial, estado de capacitación espermática, marcadores de apoptosis, marcadores de estrés oxidativo, valoración de la actividad mitocondrial y daño en el ADN (Martínez-Pastor *et al.*, 2010). La citometría de flujo, además, está siendo utilizada para analizar otros aspectos de los espermatozoides como es la separación de espermatozoides X e Y, como método previo para la obtención de embriones del sexo deseado (Johnson, 1995). El estudio de la viabilidad espermática se basa en el análisis de la integridad de la membrana plasmática de los espermatozoides, mediante el uso de dos fluorocromos combinados. Uno de ellos es capaz de penetrar la membrana plasmática dañada o degenerada, y por lo tanto, permite identificar las células muertas o en proceso de degeneración. Mientras que el otro es capaz de atravesar membranas celulares intactas, y por lo tanto, permite identificar poblaciones celulares vivas.

El *yoduro de propidio (IP)* es el más utilizado para identificar células muertas. Éste compuesto penetra en el espermatozoide con la membrana dañada; se une de forma estequiométrica al ADN de doble cadena, donde se intercala entre la doble hélice y, al ser excitado por la longitud de onda apropiada (636 nm), emite fluorescencia roja (Martínez-Pastor y *et al.*, 2010). Por otra parte, existen en el mercado una gran variedad de marcadores fluorescente específicos para células muertas con el mismo mecanismo de acción, como son el *homodímero de etidio -1 (EthD-1)* o *Yopro- 1*. Se ha comprobado que éstos son los más adaptables a la citometría de flujo clínica en comparación con las colorantes de la membrana impermeable *bisbenzimidida (Hoechst 33258)*, ya que estos provocan un rango ultravioleta y requieren un equipo UV láser (Guillan *et al.*, 2005),

En revisiones recientes de Martínez-Pastor *et al.*, (2010), encontraron que las más comunes sondas utilizadas en la impermeabilidad de la membrana para determinar la viabilidad espermática eran el *yoduro de propidio* y el *homodímero de etidio*, ya que estos son rápidos en reaccionar y fáciles de usar, y pueden ser excitados (488nm) en la mayoría de citómetros de hoy día.

En relación a la identificación de poblaciones de células vivas, se describe al grupo de la *carboxifluoresceína*. En este se encuentran el *diacetato de carboxifluoresceína -CFDA*, *diacetato de carboximetilfluoresceína -CMFDA-*, y *diacetato de carboxidimetilfluoresceína -CDMFDA-* (Garner *et al.*, 1986; Garner y Johson, 1995). Son compuestos que, al penetrar la membrana celular, se convierten en *carboxifluoresceína* por la acción de esteraras intracelulares y, al ser excitados a una longitud de onda determinada (488nm), emiten fluorescencia verde, quedando retenidos intracelularmente por la

membrana. Una de las combinaciones para identificar espermatozoides vivos-muertos es la utilización de yoduro de propidio en unión con fluorocromos del grupo de las carboxifluoresceínas.

Así, Garner *et al.*, (1986) propusieron la utilización de yoduro de propidio, el cual tiñe el núcleo de las células muertas como consecuencia de la unión a la doble hélice, y el diacetato de carboxifluoresceína, el cual es capaz de penetrar las membranas celulares y ser convertido en un componente fluorescente impermeable. Estos autores concluyen que los espermatozoides totalmente viables son los verdes, en los que no aparece ningún rastro de rojo. En estos estudios aparece una subpoblación de espermatozoides que si bien son verdes, también son rojos. Es decir, una subpoblación de espermatozoides que puede tener comprometida su supervivencia.

Merece la pena mencionar también otros fluorocromos ampliamente utilizados para identificar espermatozoides vivos, como es el SYBR-14, que es capaz de atravesar la membrana intacta y unirse al ADN de los espermatozoides. Es una molécula más estable que las basadas en la actividad de la esterasa intracelular, ya que no tiene que sufrir transformaciones para actuar, por lo que se une directamente al ADN, lo que garantiza que dichas partículas que no tienen dicho material genético no se van a marcar. El SYBR-14, por lo general, suele usarse en combinación con el yoduro de propidio (Garner *et al.*, 1994, Garner, *et al.*, 1997). Distinguiendo de esta forma dos poblaciones espermáticas, una de ellas, células muertas cuyas membrana plasmática son permeables al *IP* y otra, células viables cuyas membranas intactas son impermeables al *IP*, pero dan paso al *SYBR-14* emitiendo fluorescencia verde.

Se ha utilizando también el colorante *Hoechst (33342)* el cual, al activarse con luz ultravioleta, muestra dos picos de fluorescencia que corresponden a espermatozoides vivos (poco fluorescentes) y espermatozoides muertos (muy fluorescentes). Además, utilizando concentraciones óptimas de este colorante, se ha obtenido un tercer pico en el citómetro de flujo, que corresponde a espermatozoides subviables, los cuales podrían ser móviles pero tener disminuida su capacidad de supervivencia (Keeler *et al.*, 1983). Según la bibliografía, la utilización de dicho colorante queda limitada únicamente a longitud de onda de un espectro ultravioleta inferior a 488nm.

- **VALORACIÓN DE LA SUSCEPTIBILIDAD ESPERMÁTICA AL ESTRÉS OXIDATIVO**

La congelación seminal es una de las técnicas más demandadas en la industria equina (Samper JC *et al.*, 2007) Sin embargo, las restricciones en la mayoría de los libros genealógicos y la alta variabilidad entre la congelación de los eyaculados frenaron el desarrollo de esta tecnología, no alcanzando, todavía, un nivel óptimo de desarrollo (Loomis y Graham, 2008). Recientemente, nuevos avances en los protocolos de congelación (Vidament, Ecot *et al.*, 2000; Vidament, Yvon *et al.*, 2001; Ecot, Decuadro-Hansen *et al.*, 2005; Salazar, Teague *et al.*, 2011), y se han diseñado nuevos diluyentes (Rodríguez, Ferrusola *et al.*, 2011) para reducir la variabilidad y mejorar los resultados (Carmo, Papa *et al.*, 2005)

Durante la congelación y descongelación el esperma equino sufre daños oxidativos y osmóticos que pueden cambiar la estructura lipídica de la membrana (Ortega-Ferrusola, Sotillo-Galan *et al.*, 2008; Garcia, Fernandez *et al.*, 2011). Estos cambios conducen a la muerte espermática o modificaciones subletales que reducen la viabilidad de la población espermática tras la descongelación. La peroxidación lipídica de la membrana espermática es capaz de desencadenar fenómenos apoptóticos durante la criopreservación. La existencia de diferencias en la susceptibilidad a la peroxidación lipídica puede explicar la respuesta tan variable que muestran los eyaculados de los distintos sementales ante el proceso de criopreservación (Ferrusola, Fernandez *et al.*, 2009). Por tanto, para apoyar el Programa de Conservación del Caballo de las Retuertas, se evaluó si la elevada tasa de consanguinidad de esta raza puede provocar un aumento una mayor susceptibilidad de las membranas espermáticas al estrés

oxidativo. Así mismo, se evaluó si los parámetros de la motilidad espermática pueden estar igualmente afectados. Para apoyar esta hipótesis, recientes estudios en otra especie en peligro de extinción, la gacela, mostraron que algunos parámetros seminales (como motilidad, morfología o porcentaje de espermatozoides con el acrosoma intacto) se vieron afectados por un alto coeficiente de consanguinidad (Roldan, Cassinello *et al.*, 1998; Gomendio, Cassinello *et al.*, 2000).

Las técnicas de reproducción son una importante ayuda en el manejo de razas en peligro de extinción. El desarrollo de bancos de semen congelado y la inseminación artificial pueden ayudar a mantener la diversidad genética y recuperar el número de individuos de una raza en riesgo de extinción. En los últimos años han aumentado las publicaciones en técnicas de criopreservación en equinos; principalmente aquellos estudios enfocados en el uso de diversos crioprotectores así como en los daños espermáticos durante la congelación y descongelación (Pena. García *et al.*, 2011). Se han identificado fenómenos de apoptosis en semen equino refrigerado y congelado (Ortega-Ferrusola. Sotillo-Galan *et al.* 2008; Bolanos. Moran *et al.* 2012) siendo el principal factor desencadenante es el estrés oxidativo. Cuando se origina un desequilibrio entre la generación y eliminación de ROS durante el almacenamiento, se alteran las funciones espermáticas (Aitken and Clarkson 1987; Baumber. Ball *et al.*, 2000). El oxígeno reactivo es originado durante el metabolismo oxidativo. En condiciones fisiológicas, tras la eyaculación, el plasma seminal protege a los espermatozoides del daño oxidativo. Los espermatozoides comienzan a generar bajos niveles de ROS para provocar la capacitación y fecundación. Sin embargo, si la fecundación no se produce, los espermatozoides continúan generando ROS a altos niveles. generándose un desequilibrio si los mecanismos antioxidantes de las células espermáticas no son capaces de contener este exceso de ROS. En estos casos, se provoca un estrés oxidativo y se activa la apoptosis espermática (Aitken, Jones *et al.*, 2012). Durante el almacenamiento de esperma, el daño por estrés oxidativo se incrementa debido a la retirada de plasma seminal y al uso de diluyentes carentes de antioxidante. Una de las consecuencias del estrés oxidativo es la peroxidación lipídica (POL) de las membranas espermáticas. La POL puede activar un fenómeno apoptótico que lleva al envejecimiento prematuro y a una reducción en la viabilidad del esperma procesado (Ferrusola, Fernandez *et al.*, 2009).

2.9 CRIOPRESERVACIÓN

La criopreservación es la conservación a largo plazo de células vivas a bajas temperaturas, tales como el punto de ebullición del nitrógeno líquido ($-196\text{ }^{\circ}\text{C}$). Estas temperaturas hacen que disminuya el metabolismo celular, provocando un estado de inactividad total en las células espermáticas, del cual sólo se recuperan cuando son descongeladas y llevadas a temperatura ambiente (Watson y Morris 1987).

La criopreservación es una importante herramienta complementaria a la conservación *in situ* que puede actuar como un reservorio genético en caso de pérdida excesiva de variación genética. Es una seguridad en caso de catástrofe, o si un problema genético aparece como consecuencia de la acumulación de genes recesivos nefastos para la población viva (Crespo García, 2003).

Puede plantearse como la mejor opción cuando las estrategias de conservación *in situ* no son lo suficientemente efectivas como para evitar esta pérdida de variación genética e, incluso, cuando está en riesgo la supervivencia de la raza (Gandini, Pizzi *et al.* 2007).

Así, la primera exigencia para la criopreservación es la disponibilidad de instalaciones que permitan el almacenamiento de las muestras en nitrógeno líquido, (Peinado y Poto, 2003)

La congelación seminal en la reproducción equina es una de las técnicas más empleadas en la actualidad; pero, el daño ocasionado en las células espermáticas tras la descongelación, sigue siendo su principal hándicap. A este inconveniente hay que añadirle que el eyaculado de un gran número de sementales no puede ser procesado para su congelación. Tanto es así que, en algunos casos, es necesario adaptar los protocolos individualmente., Además, en la inseminación con semen congelado, la tasa de fertilidad de las hembras es menor que con el empleo de semen fresco o refrigerado (Kikutani, Taga *et al.*, 1985).

El plasma seminal tiene varias funciones como: permitir una motilidad progresiva durante la eyaculación y dentro del tracto de la hembra; actuar como un medio de transporte que proporciona substratos metabólicos para mantener la viabilidad de los espermatozoides hasta la fertilización; y finalmente, debido a su volumen, aumenta la oportunidad de distribución igual de espermatozoides dentro del cuerpo y cuernos uterino, (Kikutani, Taga *et al.*, 1985). Pero, a pesar de todo, algunos componentes del plasma seminal pueden tener un efecto perjudicial sobre los espermatozoides, reduciendo su motilidad e, incluso, acelerando su muerte durante la criopreservación. Es por ello que, tras la recolección con vagina artificial, se procede a la centrifugación de la muestra para separar el plasma seminal y concentrar los espermatozoides.

La centrifugación del semen no es del todo beneficiosa para los espermatozoides: Se sabe que en dicho proceso se pierden alrededor del 15 – 20 % (Hafez, 2000) de espermatozoides viables. Por otra parte, también es sabido que la supervivencia de las células espermáticas en el plasma seminal sólo está limitada a una pequeña porción de tiempo. En términos generales, el plasma seminal es beneficioso solamente en la monta natural. Los efectos adversos de centrifugación son dependientes de la fuerza y la duración de centrifugación: En un estudio realizado por Weiss *et al.* (2004), se demuestra que los menores daños y mejor motilidad se obtuvieron centrifugando lentamente (600 g) durante tiempos prolongados (10 minutos).

Una vez que la centrifugación se ha realizado, las muestras son resuspendidas en el segundo diluyente. En este momento se deben hacer los cálculos en la concentración espermáticas que llevarán las muestras a conservar. En relación a los diluyentes, es muy difícil determinar cuál es el mejor, pues en los estudios comparativos deben ser tenidos en cuenta factores como el semental, el sistema de envasado, el enfriamiento y la velocidad de congelación así como la subjetividad de la estimación de la motilidad pos-descongelación. Además, son limitados los estudios en los cuales más de un diluyente es incluido en un mismo experimento.

Actualmente, es común el uso de dos diluyentes en la congelación de semen de equino en los protocolos de congelación:

Diluyentes para la dilución inicial y la centrifugación. Su principal objetivo es mantener la motilidad así como proteger a los espermatozoides del efecto de la centrifugación.

Diluyentes para la congelación y posterior almacenamiento. Estos tipos de diluyentes se diferencian de los anteriores en que en su fórmula incorporan crioprotectores.

Ambos son de suma importancia para el éxito de la técnica de congelación.

Existe una amplia lista de componentes de diluyentes, siendo los más habituales y encontrándose en mayor proporción yema de huevo, leche, detergente, tampones, electrolitos, antibióticos y glicerol. Para la criopreservación pueden usarse los diluyentes a base de leche descremada, como es el *INRA 82*[®], además se encuentran en el mercado otros diluyentes comerciales

muy difundidos como son *Kenney*[®] o *E-Z Mixin*[®]. Estudios comparativo de estos tres diluyentes fueron probados por Ijaz y Ducharme (1995), encontrando que el diluyente *INRA 82*[®] supera a los anteriores manteniendo su motilidad encima del (50%), durante más de 96 horas.

Cochran *et al.* (1984) usan 0,5 ml *Equex SMT*[®] o *Orvus- ES*[®] en el diluyente de lactosa-yema de huevo, Ambos compuestos contienen *sodio dodecyl (lauril) sulfato (SDS)*, y son incluidos en los diluyentes de diversas especies. *SDS* es un detergente aniónico hidrosoluble y agente humectante, usado para solubilizar proteínas. Probablemente, modifica la yema de huevo del diluyente solubilizando sus moléculas activas. La adición de 0,5 % de *Equex*[®] aumenta la longevidad de los espermatozoides descongelados, prolongando el mantenimiento de la motilidad e integridad de la membrana plasmática, (Rota *et al.*, 1997). El semen diluido con lactosa -*EDTA*-yema de huevo no necesita ser refrigerado a 5°C antes de la congelación, De esta forma puede ser envasado a temperatura ambiente.

Otro diluyente usado en la congelación de semen equino es aquel que emplea como base el *INRA 82* + 2% de yema de huevo +2,5 de glicerol.

Existen diversas opiniones en cuanto a la dilución del semen a congelar, pero en la que más consenso hay es en usar concentraciones de 50×10^6 /pajuelas de 0,5 ml (Vidament *et al.*, 2001; Squires *et al.*, 2004).

Lindsey *et al.*, (2002) utiliza bajas dosis de semen para inseminación, obteniendo resultados muy dispersos en la tasa de preñez.

Cristanelli y col. (1984), citado por Palma, (2001), congelaron semen usando una concentración de 700×10^6 espermatozoides, almacenadas en pajuelas de 0,5 ml obteniendo una tasa de preñez del 46 %.

Graham (1996) verificó que la motilidad después de la descongelación disminuyó cuando la concentración espermática fue mayor a 400×10^6 .

Otros autores observaron una tendencia de mayor tasa de preñez cuando aumentaba (1600×10^6) la concentración en relación a las menores concentraciones (400×10^6).

El envasado más comúnmente utilizado son las pajuelas de 0,5 ml y 0,25 ml, aunque también se emplean tubos de aluminio con capacidad de 5-25 ml pero las ventajas en manejabilidad y almacenamiento de las pajuelas es considerable,

El semen puede ser congelado sobre vapores de nitrógeno líquido o mediante el uso de un congelador programable. La mayor parte de los laboratorios utilizan congeladores programables a un ritmo de congelación de $-10^\circ\text{C}/\text{min}$ entre 20°C y -15°C y de $-25^\circ\text{C}/\text{min}$ ó $-60^\circ\text{C}/\text{min}$ entre -15°C y -120°C .

Para la congelación con vapores de nitrógeno, las pajuelas deberán estar dispuestas horizontalmente en un soporte metálico de uno a cuatro centímetro por encima de la interfase líquida. La distancia del nitrógeno y el tiempo de permanencia determinan la velocidad de enfriamiento y la temperatura final. El semen congelado en pajuelas de 0,5 ml deben estar mantenidas 10 minutos en los vapores antes de ser transferida al nitrógeno líquido.

Al menos tres pajuelas pos-congeladas deben de descongelarse para evaluar su calidad, ya que es sabido que el porcentaje de espermatozoides motiles después de la descongelación está relacionado con la fertilidad del semental. El semen, para ser usado en inseminación, debe de tener un porcentaje

de motilidad entre el 35% (Vidament y col., 1999) y el 50% (Squire y col., 2001). Cuando estos valores no son alcanzados, las muestras deben descartarse.

La descongelación se realiza comúnmente por inmersión en un baño maría a 37°C durante 30 segundos o a 75°C durante 7 segundos.

Palma (2001) indica que un factor a tomar en cuenta en el procedimiento de la velocidad de descongelación es la velocidad con la que fue congelada. Semen congelado con una velocidad moderada exige una descongelación de la misma forma. Si la descongelación es rápida y el hielo se disuelve rápidamente, diluye los solutos extracelulares, el agua entra rápidamente a los espermatozoides que continúan con una alta concentración de solutos, lesionándolos.

3. METODOLOGIA Y DISEÑO EXPERIMENTAL

3.1 METODOLOGIA Y DISEÑO EXPERIMENTAL DEL ANÁLISIS DEMOGRÁFICO

3.1.1 Descripción de la población

En la actualidad, existe una población de 186 animales (con perfil genético contrastado molecularmente), 108 hembras y 78 machos situados en la finca del Coto (Tabla 5). Por otro lado se mantiene una población de 109 animales en Guadiamar con distintos niveles de sangre. En este último lote, los descastes son siempre realizados sobre los animales que presentan un menor nivel de pureza. En algunas décadas esta población estará completamente absorbida por el Caballo de las Retuertas de Doñana.

Es necesario precisar que el programa de conservación de esta raza es tedioso y lento, debido a que la población equina, dentro del Parque, está restringida a un número concreto de animales no pudiendo incrementar la población.

Los animales están todos identificados y su genealogía está contrastada con marcadores del K. Por tanto, cualquier influencia genética reciente de animales externos a estas poblaciones está descartada.

Tabla 5. Caballos de las Retuertas en cada una de las reservas, en las cuadras y en campanarios de Azaba

	HEMBRAS			MACHOS			
RBD (COTO)	1-2 AÑOS	> 3 AÑOS	TOTAL	1-2 AÑOS	> 3 AÑOS	TOTAL	TOTAL
RETUERTAS	27	54	81	12	17	29	110
	HEMBRAS			MACHOS			
GUADIAMAR	1-2 AÑOS	> 3 AÑOS	TOTAL	1-2 AÑOS	> 3 AÑOS	TOTAL	TOTAL
RETUERTAS	2	5	7	3	9	12	19
31/32 RETUERTAS	3	0	3	3	0	3	6
15/16 RETUERTAS	3	7	10	8	0	8	18
7/8 RETUERTAS	13	14	27	9	0	9	36
3/4 RETUERTAS	0	30	30	0	0	0	30
TOTAL	21	56	77	23	9	32	109
	HEMBRAS			MACHOS			
CUADRAS	HEMBRAS			MACHOS			

ANÁLISIS DEMOGRÁFICO Y CARACTERIZACIÓN SEMINAL DEL CABALLO DE LAS RETUERTAS DE DOÑANA

	1-2 AÑOS	> 3 AÑOS	TOTAL	1-2 AÑOS	> 3 AÑOS	TOTAL	TOTAL
RETUERTAS	0	2	2	2	6	8	10
15/16 RETUERTAS	0	0	0	0	1	1	1
7/8 RETUERTAS	0	0	0	0	1	1	1
TOTAL	0	2	2	2	8	10	12
	HEMBRAS			MACHOS			
CAMPANAIROS DE AZABA	1-2 AÑOS	> 3 AÑOS	TOTAL	1-2 AÑOS	> 3 AÑOS	TOTAL	TOTAL
RETUERTAS	2	2	4	0	7	7	11
15/16 RETUERTAS	1	0	1	0	0	0	1
7/8 RETUERTAS	1	9	10	0	0	0	10
TOTAL	4	11	15	0	7	7	22
	HEMBRAS			MACHOS			
TOTAL	1-2 AÑOS	> 3 AÑOS	TOTAL	1-2 AÑOS	> 3 AÑOS	TOTAL	TOTAL
RETUERTAS	31	63	94	17	39	56	150
31/32 RETUERTAS	3	0	3	3	0	3	6
15/16 RETUERTAS	4	7	11	8	1	9	20
7/8 RETUERTAS	14	23	37	9	1	10	47
3/4 RETUERTAS	0	30	30	0	0	0	30
TOTAL	52	123	175	37	41	78	253

3.1.2 Recogida de las muestras

Se tomaron muestras de sangre (Imagen 5) mediante venopunción yugular en tubo con anticoagulante a toda la población de los dos núcleos de caballos que se encuentran en la Reserva Biológica de Doñana (Fincas Guadiamar y El Coto). También se tomaron muestras de los caballos Marismeños de ganaderías que aprovechan los recursos del Parque y sus proximidades (aprox. 100 muestras/año)



Imagen 5. Detalle de las mediciones zoométricas de los caballos en condiciones de gran dureza.

3.1.3 Tipificación de las muestra

La extracción del ADN de la sangre se realizó mediante lavados sucesivos en TE (Tris HCl 10 mM. pH 7,5; EDTA 1 mM. pH 8) y posterior digestión con *Proteinasa K* (Goldenberger, Perschil *et al.*, 1995). Se amplificaron específicamente los loci del ADN de interés con una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Saiki, Sone *et al.*, 1985). Se emplearon cebadores marcados con fluorocromos que permitieron la caracterización alélica con un secuenciador automático "ABI 377 XL". Todos los animales incluidos en el estudio fueron tipificados de acuerdo a la batería de 26 microsatélites equinos que se transcribe a continuación:

AHT4, AHT5, HMS3, HMS6, HMS7, HTG4, VHL20, ASB2, HTG10, ASB23, ASB17, LEX3, LEX33, TKY279, TKY287, TKY294, TKY297, TKY301, TKY312, TKY321, TKY325, TKY333, TKY337, TKY341, TKY343, TKY344, TKY374, TKY394.

Las muestras amplificadas se sometieron a una electroforesis en secuenciadores automáticos ABI 377 XL (Imagen 6). El análisis de densitometría de la fluorescencia y asignación de tamaños en pares de bases a los fragmentos obtenidos se realizaron con la aplicación GENESCAN ANALYSIS SOFTWARE. La caracterización genética basada en los tamaños obtenidos de los fragmentos amplificados se realizó con la aplicación GENOTYPER.

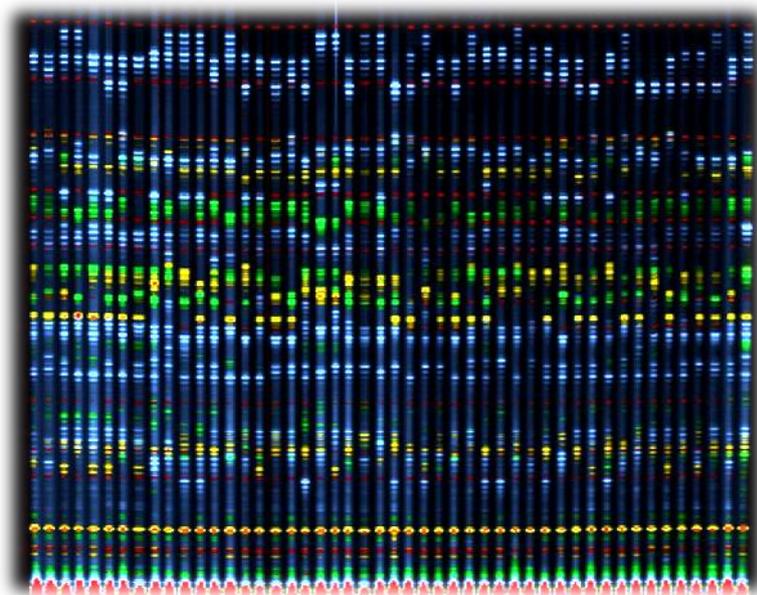


Imagen6. Electroforesis en gel de poliacrilamida con Secuenciador ABI 377XL

La identificación individual es consecuencia del registro de la fórmula genética compuesta por los genotipos de cada uno de los marcadores en una base de datos de desarrollo propio y su correspondencia con los datos morfológicos recogidos de cada animal y con el microchip instalado en cada uno de ellos.

El control de filiación se realizó en aquellos individuos de los que se conocían sus padres comparando las fórmulas genéticas de éstos con la del animal en cuestión. En el caso de que no se supiera cuál es el progenitor se cruzó la información de cada uno de ellos con los más probables para completar al máximo los datos genealógicos del registro.

Se hizo una búsqueda de los progenitores candidatos en los casos que hubiera dudas con los registros genealógicos usando los datos demográficos conjuntamente con las fórmulas genéticas obtenidas.

3.1.4 Análisis poblacional

Disponiendo de toda la información sobre los valores demográficos de la población así como los recursos conservados *in vivo* e *in vitro*, se incorporaron predicciones realizadas por simulación, sobre la respuesta de la población en términos de incremento de la consanguinidad y mantenimiento del efecto medio de fundadores sobre la variabilidad genética de la población.

Así, en primer lugar, se calcularon los coeficientes de consanguinidad individual (F_i) y el grado de parentesco entre individuos (a_{ij}), a partir del programa *ENDOG*, teniendo en cuenta que:

$$a_{ij} = \frac{1}{2} (a_{i, \text{Padre de } j} + a_{j, \text{Madre de } i})$$

$$a_{ij} = a_{ji}$$

$$a_{ij} = 1 + F_i$$

$$F_i = \frac{1}{2} a (\text{Padre de } i, \text{Madre de } i)$$

La consanguinidad individual (F_i), representa la probabilidad de que dos alelos de un mismo locus sean iguales por descendencia. Por su parte, el grado de parentesco (aij) entre dos individuos (i y j) representa el doble de la probabilidad de que en un locus determinado, un alelo tomado aleatoriamente de un individuo i y un alelo tomado al azar del individuo j , sean iguales por descendencia o, lo que es igual, sean copias de un mismo gen.

El incremento de consanguinidad por año ($\Delta F/\text{año}$) se obtuvo mediante regresión del coeficiente de consanguinidad individual (F_i) con el año de nacimiento, habiéndose utilizado para ello el procedimiento *PROC GLM* del paquete estadístico *SAS*, siguiéndose el siguiente modelo lineal:

$$F_{ij} = b_0 + b_1 \text{ año}_i + e_{ij}$$

Donde:

F_{ij} representa la consanguinidad individual del individuo j nacido en el año i .

b_0 , el coeficiente de regresión lineal de la consanguinidad individual en el año de nacimiento.

e_{ij} , el error asociado con la ij observación.

A partir de $\Delta F/\text{año}$, se determinó el incremento de consanguinidad por generación ($\Delta F/\text{generación}$), como:

$$\Delta F/\text{generación} = \Delta F/\text{año} \times L$$

Donde:

L representa el intervalo generacional medio.

En la última fase del análisis demográfico, se estimaron los números efectivos de fundadores (fe) y de ascendientes (fa), así como las contribuciones genéticas de fundadores (qk) y de ascendientes (pk). Estas metodologías se basan en el principio de que un alelo tomado al azar de cualquier *locus* de un determinado animal tiene un 50% de probabilidad de tener un origen en el padre e igual probabilidad de tener su origen en la madre. Siguiendo este mismo razonamiento, un animal tiene un 25% de probabilidad de recibir un alelo de cada uno de los abuelos y un 12,5% de cada uno de los bisabuelos. Aplicándose esta regla al pedigrí del Caballo de las Retuertas, se pudo calcular la probabilidad de origen de sus genes a partir de los fundadores existentes en su ascendencia (animales con padre y madre desconocidos) o, de otro modo, la contribución genética de un fundador k (qk) para un determinado individuo o conjunto de individuos.

Finalmente, y para completar el árbol genealógico de la raza, empleando el software *CERVUS*, se combinaron los datos de las fórmulas genéticas con la información demográfica obtenida. La representación gráfica del árbol se llevó a cabo con el programa *PEDIGRAFH*.

3.2 METODOLOGÍA Y DISEÑO EXPERIMENTAL DE LA CARACTERIZACIÓN SEMINAL

3.2.1 Animales

El número de animales sometidos a extracción y crioconservación de germoplasma, así como el número de dosis de cada uno de ellos, fue determinado según los criterios recomendados por Lömker y Simon, (1994), teniendo en cuenta parámetros como la capacidad fecundante media del semen, el intervalo generacional, etc.

El número de machos necesarios se determinó con los siguientes cálculos:

- El número de dosis necesarias para obtener un potro, con el semen criopreservado de nuestro banco.
- Número de dosis totales necesarias para conseguir la reconstrucción de la raza mediante retrocruces con hembras de razas afines. Para ello, se calculó la proporción de genoma recuperado en las distintas generaciones de retrocruce utilizando la formula siguiente:

$$Gr = 1 - 0,5n-1$$

Donde:

Gr: es el genoma recuperado.

n: es el número de generaciones de retrocruces transcurrido a partir del inicio de la reconstrucción.

El resultado de esta inferencia permite predecir en qué generación se considera la raza reconstruida.

La función de cálculo empleada para obtener el número de dosis necesarias se basó en la metodología propuesta por Lömker y Simon, (1994):

$$D = d N (rn-1) / (r-1)$$

Donde:

D: corresponde a las dosis totales necesarias.

d: número de dosis necesarias para obtener un parto.

N: número de hembras jóvenes fértiles que se desean tener en la generación n.

n: generación en la que se considera la raza restaurada.

r: número de inseminaciones estimadas que serán necesarias para obtener una hija fértil, o inversa del número de *f* que corresponde al número de hijas fértiles esperada por inseminación.

Los cálculos realizados para conocer el número de dosis seminales necesarias para la reconstrucción de la raza por medio de retrocruces se llevó a cabo tomando en cuenta los siguientes parámetros reproductivos:

d: 8

N: En este caso, se decidió en función del incremento de la consanguinidad que se estaba dispuesto a asumir por generación; de tal forma que, siguiendo las recomendaciones técnicas de aceptar un máximo de incremento de la consanguinidad menor del 2% por generación, se necesitaría un mínimo de 25 hembras fértiles en la generación n.

$$f = 1/4 = 0,25 \quad r = 1/f = 4,00$$

Fueron capturados 5 potros (4 machos y 1 hembra), con edades comprendidas entre los 3,5 y 4 años de edad, y trasladados al Centro Agropecuario de la Diputación de Córdoba (España).

Como criterio de selección de estos sementales y haciendo uso de toda la información disponible, se tuvo en cuenta que fuesen representativos de la raza, de acuerdo con sus características

morfológicas y genéticas; garantizando, así, su máxima repercusión en la variabilidad genética de la población.

3.2.2 Localización y periodo del experimento

Las actividades experimentales fueron realizadas en el laboratorio de reproducción asistida del departamento de Genética de la Universidad de Córdoba (Grupo PAIDI-AGR 218). Los animales se encontraban ubicados en el Centro Agropecuario de la Diputación de Córdoba, donde se realizaban las extracciones seminales. La localización geográfica se corresponde con el sur de la península ibérica, entre las coordenadas 37º 53' de latitud norte, 4º 46' de longitud oeste y 110m de altitud. El clima es tipo mediterráneo, con un índice de precipitaciones de 1034 l/m². El periodo experimental se realizó durante una etapa de tres años (2007-2010).

3.2.3 Adaptación

Para la realización de dicha experiencia, fue necesario someter a los futuros donantes a 2 etapas de manejo previo al comienzo de la recogida de las muestras seminales que dieron lugar a la información analizada en el presente trabajo (Vallecillo *et al.*, 2008a).

La primera de ellas fue la adaptación al medio doméstico; ya que, al tratarse de animales asilvestrados, fue necesario, en primer lugar, dar un tiempo de adaptación seguido de un riguroso plan de domesticación, el cual duró aproximadamente unos 10 meses.

Todos los animales representaban un peligro serio para la integridad de los investigadores hasta que completaron el periodo de adaptación; por ello, hasta su conclusión no se comenzó con el trabajo reproductivo específico.

3.2.4 Adiestramiento

Una vez sometidos al manejo zootécnico convencional, se comenzó con la segunda fase previa: el entrenamiento para la colecta seminal.

Comprendió, en primer lugar, un periodo de entrenamiento de los sementales a la hembra y a la vagina artificial.

Durante las primeras sesiones de entrenamiento, se pretendía sólo acostumbrar a los machos a la presencia del personal y para despertarle el interés por la hembra. En todas las sesiones se evitaron realizar ruidos y movimientos bruscos. La duración máxima de cada una de ellas fue de 40 minutos, tras lo cual se devolvía el caballo a su sitio, tanto si saltaba o no sobre la hembra. Debido a que la recuperación de la lesión de la hembra Retuerta fue muy lenta, se empleó una hembra de Pura Raza Española

3.2.5 Recolección de semen

Previo a la operación de extracción seminal, se siguieron los siguientes pasos: Lavado la vulva y partes perianales de la hembra con abundante agua y jabón y secado posteriormente y lavado del pene del caballo. Para la extracción seminal se empleó la vagina artificial tipo *Misuri*. Se analizaron una serie de parámetros para conocer si el semen cumplía unos requisitos mínimos para poder ser congelado: Motilidad masal mayor de 3 (escala de 1-5), motilidad individual mayor del 60 % y porcentaje de vivos muertos mayor del 60 % (tinción vital *eosina/nigrosina*), concentración de espermatozoides superior a

250 x10⁶ espermatozoides/ml. Para llevar a cabo el proceso de congelación se emplearon dos diluyentes; uno para la dilución inicial y la centrifugación, y otro para la congelación. Después de la extracción, el semen se centrifugó para separar el plasma seminal y concentrar los espermatozoides. A continuación, se le añadió el primer diluyente, cuya función es protegerlo durante el centrifugado. Posteriormente, se extrajo el plasma seminal con una bomba de vacío y se resuspendieron los espermatozoides en el segundo diluyente, que cuenta con crioprotectores para el proceso de congelación. Tras esta fase, la muestra se estabilizó 2 horas en cámara frigorífica a 5°C para que alcanzara gradualmente esta temperatura. A continuación, el semen se envasó en pajuelas de 0,5 ml. A cada semental se le asignó un color de pajuela diferente, para facilitar la identificación y evitar errores durante el manejo. El envasado se realizó con la ayuda de una envasadora automática (*IMV® L' Eagle*, Francia). El proceso de congelación de las muestras se llevó a cabo en un criocongelador programable (*Mini digicool*, *IMV® L' Eagle*. Francia), siguiendo curva de congelación estándar para la especie equina. Las dosis seminales se almacenaron en tanque de nitrógeno líquido (-196 °C), Tras cada congelación, se descongelaron tres pajuelas por inmersión en un baño maría a 37°C durante 20 segundos para evaluar el porcentaje de espermatozoides móviles después de la descongelación.

3.2.6 *Análisis del semen*

Para desarrollar esta caracterización seminal, se planteó, en primer lugar, conocer el comportamiento de cada una de las variables estudiadas a través de los cálculos descriptivos y, como segunda instancia, la evaluación de los efectos fijos de los factores que afectan las variables seminales estudiadas, mediante la aplicación de modelos unifactoriales.

En la primera fase del trabajo, se pretendió conocer cuáles eran las características naturales del semen del caballo de las Retuertas, para determinar la mejor forma de conservar y preservar el material genético de la raza. En una segunda fase, se planteó estudiar el comportamiento de los factores individuales sobre las características del semen. Tras su recogida, cada eyaculado se trasladó, inmediatamente, al laboratorio, donde se valoraron una serie de características macro y microscópicas de cada uno de ellos, con el objeto de determinar la calidad seminal y valorar la posible influencia que ésta pudiese tener sobre los posteriores procedimientos de diluyoconservación y congelación del semen; así como en su capacidad fecundante. De manera rutinaria, se valoraron las siguientes características:

- *Volumen del eyaculado*

Se realizó sobre el semen fresco, determinándose el volumen del eyaculado por observación directa de los tubos graduados (50 ml, *Pirec®*) utilizados tras la recogida. Estos tubos se colocaron, inmediatamente tras la obtención del eyaculado, en un baño termostático a 37°C (*Precistern*, *Selecta®*) manteniéndose atemperados durante todo el proceso de contrastación seminal.

- *Motilidad masal*

Se determinó depositando una gota de la muestra seminal fresca sin diluir (5 µl) sobre un porta-objetos atemperado a 37°C en una placa térmica y se visualizó la muestra en un microscopio óptico (*CX 21*, *Olympus®*) a 10X. Se evaluó de forma subjetiva la formación y progresión de ondas producidas por la masa espermática en movimiento en una escala de 0 a 5.

- *Motilidad progresiva*

Se estimó el porcentaje de espermatozoides en movimiento (de 0 a 100). Se obtuvo mediante observación en microscopio óptico (*CX 21, Olympus®*) a 10X de una gota seminal (5 µl) generalmente diluida a 25×10^6 dispuesta entre el portaobjetos y cubreobjetos previamente atemperados en pletina termostática (*HT 200, Minutüb*) a 37°C. El valor de la motilidad progresiva se expresó en porcentaje.

- *Concentración*

La concentración de los eyaculados fue determinada mediante un espectofotómetro (*Spermacue® Minitüb*), calibrado para la especie equina con determinaciones comparativas de densidad en la cámara de contaje de *Bürkner*. La muestra de medición es semen diluido en suero fisiológico (1:20). El microprocesador lleva a cabo la medición mostrando los resultados en pocos segundos. La concentración se expresa en millones de espermatozoides por ml de eyaculado.

3.2.7 *Análisis unifactorial de efectos fijos y prueba a posteriori de homogeneidad de medias para las características seminales de Caballos de la Retuerta*

Para llevar a cabo la segunda parte de caracterización del semen, se realizó un estudio sobre la influencia de efectos fijos sobre las características seminales (volumen, concentración, motilidad masal, motilidad progresiva). Se aplicó un análisis unifactorial de efectos fijos, desarrollado a través de un análisis de la varianza que incluyó como efecto los siguientes factores: *SEMENTAL* y *DILUYENTE*.

El modelo de análisis de la influencia de los efectos fijos considerados sobre las características seminales fue el siguiente:

$$Y_{ijk} = \mu + SE_i + DJ_j + E_{ij}$$

Donde:

Y_{ijk} : Observaciones para variables dependientes (Volumen, Concentración, Espermatozoides totales, Motilidad masal, Motilidad progresiva).

μ : Media poblacional para las variables estudiadas

SE_i : Efecto fijo del factor semental

DJ_j : Efecto fijo del factor diluyente

E_{ij} : Error residual

En el modelo inicial de análisis se incluyó la interacción doble de los factores semental y diluyente. Dado que la interacción no resultó significativa para ninguna de las variables testadas, se procedió a la retirada del modelo de análisis.

La solución de este modelo se realizó a través del modelo lineal general, utilizando el procedimiento *PROC. GLM* del paquete estadístico *SAS Versión 8,2 (SAS, 2001)*. Así mismo, se realizó el test *T a posteriori* para comprobar los grupos de homogeneidad que se establecían entre los distintos niveles de los factores estudiados.

3.2.8 Criopreservación seminal con diversos diluyentes

- *Preparación y almacenamiento de los diluyentes (base INRA 96®)*

Se llevaron a cabo pruebas de congelación con distintos tipos y porcentajes de crioprotectores, como el glicerol o las amidas (Tabla 6). El objetivo de este estudio fue conseguir un diluyente de baja toxicidad y máxima protección frente a la congelación diseñado específicamente para los individuos cuyo semen mostrara problemas para la congelación empleando los diluyentes comerciales o los preparados con los componentes que marcan los protocolos estándares. Se requirió un estudio individualizado para cada semental.

El diluyente se preparó para su uso de la siguiente manera:

Tabla 6. Componentes de los distintos diluyentes para el semen congelado del caballo de las Retuertas

	DIL. CENTR.	DIL. 1	DIL. 2	DIL. 3	DIL. 4	DIL. 5
BASE	INRA 96	INRA 96	INRA 96	INRA 96	INRA 96	INRA 96
YH	3,5%	3,5%	3,5%	3,5%	3,5%	3,5%
PASTA EQUEX	-	0,4%	0,4%	0,4%	0,4%	0,4%
GLICEROL	-	3,5%	1%	1%	1%	1%
DMF	-	-	2,5%	4%	-	-
MF	-	-	-	-	2,5%	4%

YH=Yema de huevo, DMF=Dimetilformamida, MF=Metilformamida, Dil. Centr=Diluyente de centrifugación.

Tras seleccionar aquellas muestras de semen que presentaron una concentración superior de 50×10^6 espermatozoides/ml, volumen mayor a 1 ml, así como una motilidad superior al 50%, los eyaculados de cada uno de los sementales fueron sometidos a los procedimientos de dilución y conservación que a continuación se describen:

- *Primera dilución del semen*

Después de la recolección de los eyaculados, y pasados al laboratorio, éstos fueron diluidos con el diluyente de centrifugación descrito anteriormente, a temperatura ambiente en alícuotas de igual volumen seminal, mientras se realizaban los cálculos necesarios para determinar el número de espermatozoides totales de la muestra. El objetivo de esta primera dilución fue calcular el número de dosis de cada eyaculado, así como determinar el volumen total de diluyente requerido. El volumen final del diluyente añadido se calculó dividiendo el número total de espermatozoides de la muestra entre 150×10^6 , haciendo esto con el único objetivo de conseguir que cada mililitro de muestra contuviera 150×10^6 millones de espermatozoides.

- *Centrifugación*

Se centrifugó el eyaculado a 600 g durante 10 min para eliminar el plasma seminal. Para proteger las células espermáticas, se aplicó un colchón (*Cushion, IMV*) en el fondo de cada tubo de centrifugación; Así, se consiguió que el pelet de espermatozoides no impactara directamente contra este fondo, disminuyendo el porcentaje de mortalidad espermática por el efecto de la centrifugación.

- *Segunda dilución del semen*

Tras la centrifugación y retirada meticulosa del sobrenadante, se resuspendió el pelet de espermatozoides en el diluyente de congelación, respetando la dilución final deseada, calculada en pasos anteriores.

- *Envasado del semen*

Para realizar esta fase, se utilizaron pajuelas de PVC (*IMV, L'Aigle, France*) de 0,5 ml. La operación se llevó a cabo a temperatura de laboratorio (22º C), utilizando el sistema de llenado de aspiración manual, con la ayuda de barquetas, soporte de barqueta y peines de aspiración (*IMV, L'Aigle, Francia*). Las pajuelas se llenaron dejando una cámara de aire de aproximadamente 1 cm de longitud en el extremo abierto de la pajuela, para evitar el contacto directo del semen con el sistema de sellado y teniendo en cuenta el posterior aumento de volumen en el proceso de congelación. El sellado de las pajuelas fue llevado a cabo con alcohol polivinil (*IMV, L'Aigle, Francia*). Seguidamente, y con la ayuda de un calibrador para pajuelas de 0,5 ml, las dosis fueron colocadas en rampas de congelación horizontales con capacidad para 45 pajuelas de 0,5 ml. Cabe destacar que cada pajuela de 0,5 ml contiene aproximadamente 50 millones de espermatozoides, y que son necesarias 8 pajuelas para cada dosis seminal (400 millones de espermatozoides)

- *Refrigeración seminal*

Tras aproximadamente 20 minutos de estabilización a la temperatura ambiente de laboratorio (22º C), las muestras pasaron a cámara frigorífica (*Frisur®*) a una temperatura de 4º C, durante 2 horas. Esta fase constituyó el periodo de equilibrado, que persigue obtener un descenso lento de la temperatura de la muestra, desde temperatura ambiente hasta 4º C. Durante este periodo de equilibrado, se controló que la temperatura de la cámara se mantuviese a 4 ºC durante todo momento, mediante la utilización de un termómetro de varilla manual.

- *Congelación y almacenamiento seminal*

Las muestras fueron sometidas al proceso de congelación en biocongelador programable, *Micro Digit-cool®*, (*IMV L'Aigle, Francia*), con capacidad para congelar 180 pajuelas de 0,5 ml/congelación. La operación se llevó a cabo de acuerdo a la siguiente rampa de descenso (Gráfico 1): de +4º C a -100º C a una velocidad de +60º C/min.; de - 100º C a -140º C a una velocidad de 20º C/min. Posteriormente, las muestras fueron sumergidas en caja de *Porexpan®* con nitrógeno líquido y clasificadas en Visotubos (*IMV L'Aigle, Francia*) para su posterior almacenaje en contenedor de nitrógeno líquido, (*B2035, Cryo Diffusion®*), hasta el momento de su posible utilización (*Vallecillo et al., 2008b*).

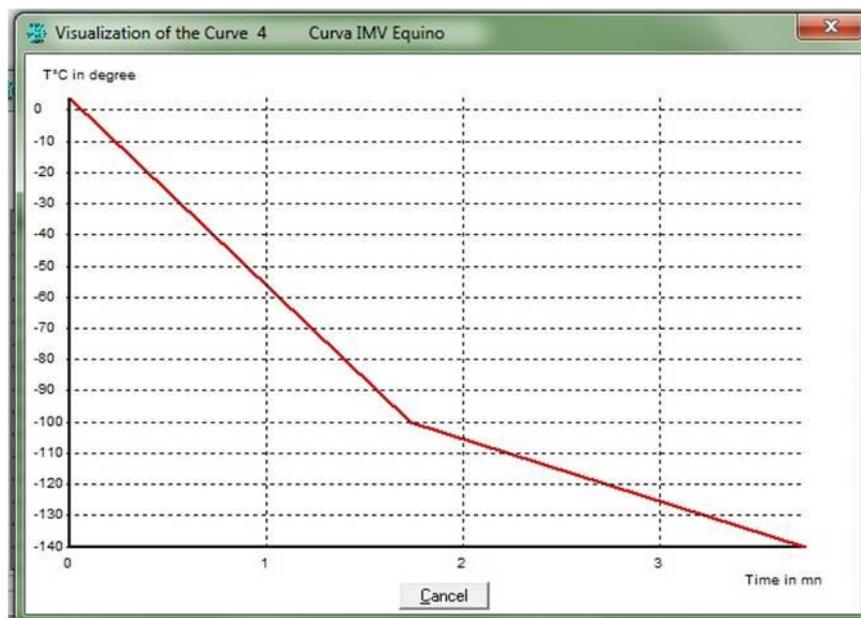


Gráfico 1. Representación esquemática de la rampa de congelación. El eje de Ordenadas (Y) representa el descenso gradual de la temperatura (°C) y el eje de Abscisa (X) representa el tiempo parcial de cada rampa de congelación, así como el tiempo total que dura la congelación.

3.2.9 Estimación de la calidad del semen mediante sistema CASA

Es importante la valoración *in vitro* del semen para determinar del grado de conservación del semen congelado tras la descongelación.

La calidad del semen (velocidades y motilidad), fue medida usando un sistema computarizado de análisis de esperma (Sistema CASA, ISAS® Proiser, Valencia, España). El análisis se basó en el examen de 25 imágenes consecutivas digitalizadas, obtenidas de un solo campo, usando un objetivo de contraste de fase de 10X, (Olympus CX 41, Tokio, Japón), y atemperado con la pletina termostática (37°C). El semen fue cargado en cámaras Lejas de 20 μm de profundidad (micro células Leja 16x25, Amsterdam, Holanda), Las imágenes fueron tomadas en un lapso de 1 segundo, la velocidad de captura de cada imagen fue por lo tanto de 1 cada 40 microsegundos, (Figura 8). Con respecto a los parámetros de ajuste para el programa, los espermatozoides con una velocidad promedio (VAP) $<10\mu\text{m}/\text{segundo}$ fueron considerados inmóviles, mientras que los espermatozoides con una velocidad promedio $>15\mu\text{m}/\text{segundo}$, se consideraron móviles. Los espermatozoides con una desviación $<45\%$ de una línea recta, se designaron linealmente móviles. La cinemática de las muestras seminales fue evaluada después de un periodo de criopreservación de 1 año.

Se calcularon los estadísticos descriptivos de tendencia central y de dispersión como son: el tamaño de la muestra, media, rango, desviación estándar, coeficiente de variación y error estándar. Para los parámetros de velocidad y descriptores cinemáticos del semen criopreservado mediante el sistema CASA (Tabla 7): velocidad curvilínea (VCL), velocidad rectilínea (VSL), velocidad promedio (VAP), índice de linealidad (LIN), índice de rectitud (STR). Los resultados se refieren tanto de forma global para el conjunto de todos los sementales, así como para el factor de variación semental.

La solución de este modelo estadístico, se realizó a través del modelo general lineal, utilizando el procedimiento PROC. GLM del paquete estadístico SAS Versión 8.2 (SAS, 2001).

Para el cálculo de los estadísticos descriptivos se utilizó el procedimiento *PROC. MEANS*, del mismo paquete estadístico.

Tabla 7. Parámetros de velocidades medidos por sistema CASA.

Parámetro	Siglas	Unidad de medida
Velocidad curvilínea	VCL	μm/segundo
Velocidad rectilínea	VSL	μm/segundo
Velocidad promedio	VAP	μm/segundo
Índice de linealidad	LIN	%
Índice de rectitud	STR	%

3.2.10 Evaluación de la vitalidad espermática y grado de apoptosis en el semen criopreservado mediante citometría de flujo.

Por otra parte, mediante el estudio de cada una de las células espermáticas, se pretendió conocer el estado de viabilidad y grado de apoptosis del semen criopreservado, así como el grado de daño producido durante el proceso de congelación. *Detección de grado de apoptosis tras los procesos de congelación y descongelación*

Con el fin de conocer el estado del semen y los daños sufridos durante el proceso de criopreservación, se calculó el porcentaje de células espermáticas vivas así como su grado de apoptosis de las 19 congelaciones realizadas y que forman parte de los 4 sementales donantes. La utilización de marcadores fluorescentes asociados a la citometría de flujo permitió el análisis objetivo de millares de células en un corto espacio de tiempo.

La evaluación de los parámetros de viabilidad, así como su grado de apoptosis se realizó mediante la coloración con *yoduro de propidio (IP)* y *hemodímero de etidio (Eth)*. Las muestras fueron procesadas según se describe en Peña *et al.*, 2005, con adaptaciones a la especie equina (Pena, Saravia *et al.*, 2005; Ortega-Ferrusola, Sotillo-Galan *et al.*, 2008). Para ello, se tomó una alícuota de 1 ml de semen diluido en PBS (5×10^6 espermatozoides/ml) con 3 μl YO-PRO-1 (25 mM) y 1 μl *ethidium homodimer-1* (1,167 mM; *Molecular Probes Europe. Leiden, The Netherlands*). Tras homogenizar cuidadosamente, se incubó la suspensión a 37°C durante 16 minutos, a oscuras. La utilización de las dos sondas de fluorocromos utilizadas, permite diferenciar 4 sub-poblaciones:

- E1 representa espermatozoides apoptóticos tardíos (*IP+ / Eth+*), Los espermatozoides se tiñen tanto con YO-PRO-1 como con ethidium homodimer (emitiendo fluorescencia verde y roja).
- E2 representan a los espermatozoides muertos o necróticos (*IP- / Eth+*) los cuales se tiñen sólo con *ethidium homodimer* (emitiendo fluorescencia roja).
- E3 representa espermatozoides vivos, (*IP- / Eth-*) Subpoblación espermática sin teñir: la cual se considera viva y sin alteraciones en la membrana.
- E4 representa espermatozoides apoptóticos tempranos. Mostrando un incremento en la permeabilidad de la membrana (*IP+ / Eth-*), que permite la entrada selectiva de ciertas moléculas (Ormerod, Sun *et al.*, 1993; Wronski, Golob *et al.*, 2002). Esta subpoblación contiene espermatozoides, los cuales pueden mostrar daños tempranos o variaciones fisiológicas. Este aumento de permeabilidad de la membrana durante las primeras fases del

daño por congelación, permite la penetración en la célula de *YO-PRO-1* pero no de *ethidium homodimer* (Wronski, Golob *et al.*, 2002). No pudiendo entrar ninguno de los dos en las células intactas.

El análisis de las muestras en citómetro de flujo, se llevó a cabo en citómetro *EPICS XL* (Coulter Corporation, In., Miami, FL, USA). Las muestras fueron excitadas por un láser de Argón a una longitud de onda de 488 nm, (Cyomics, Coherent, Santa Clara, CA, USA). Los espermatozoides contados por el citómetro, según presentaran fluorescencia o no por la combinación de *yoduro de propidio* y *hemodímero de etidio*, fueron analizados usando el software *EXPO 2000*. Las subpoblaciones fueron divididas por cuadrantes, y la frecuencia de cada subpoblación fue cuantificada. Las medidas fueron expresadas como porcentaje de células que emiten fluorescencia. En cada alícuota se evaluaron un mínimo de 20000 células, a un flujo de 200-300 células/segundo.

Para llevar a cabo dicha experiencia, se calcularon los valores medios de los diferentes grados de daños en el semen y clasificados en función del semental. Por otra parte, se realizó un análisis de varianza simple de efecto fijo sobre la vitalidad espermática y grado de apoptosis.

El modelo simple general queda establecido de la siguiente forma:

$$Y_{ij} = \mu + SE_j + E_{ij}$$

Donde:

Y_{ij} : Observaciones para variables dependientes estudiadas,

μ : Media poblacional para las variables estudiadas,

SE_j : Efecto fijo del factor semental,

E_{ij} : Error residual,

La solución de este modelo estadístico se realizó a través del modelo general lineal, utilizando el procedimiento *PROC. GLM* del paquete estadístico *SAS* Versión 8,2 (*SAS*, 2001).

- *Valoración de la susceptibilidad espermática al estrés oxidativo*

Además, se empleó la sonda *BODIPY 581/591-C11* (Molecular Probes) para la detección de peroxidación lipídica (*POL*). Dicha sonda se unió a una alícuota de espermatozoides (2×10^6 espermatozoides/ml), llevándola a una concentración final de 2mM. Los espermatozoides fueron incubados a 37°C durante 30 minutos. Posteriormente, se centrifugó para eliminar el exceso de sonda que no se ligó a los espermatozoides. Finalmente, se analizó con el citómetro de flujo.

4. RESULTADOS

4.1 RESULTADOS DEL ANÁLISIS DEMOGRÁFICO

Con toda la información demográfica, se representa la distribución de todo el censo de los animales diferenciando las edades y el sexo en una pirámide de edades (Gráfico 2). En el gráfico 2, se observa como existe un desequilibrio entre machos y hembras en la mayoría de las edades, exceptuando los animales de 1, 5 y 12 años, entre otros, donde el número de machos y hembras está compensado. Cabe destacar cómo, en los animales de 4 años, hay un descenso en la población muy pronunciado, correspondiéndose con un invierno (2009-2010) de inundaciones en el que se ahogaron muchos potros, y pudiendo ser ésta la principal causa que justifique esta disminución tan acusada de animales en ese año puntualmente.

Además, la pirámide se presenta sesgada hacia la izquierda, lo que quiere decir que existe un mayor número de animales jóvenes.

Otro aspecto interesante es la gran fluctuación de animales registrados año tras año; el gráfico 2 no presenta una distribución normal en la que los animales de edades intermedias debieran representar el grueso de la población; en este caso, aparece una distribución en diente de sierra, hecho que puede explicarse por el método de recogida de datos censales: Como ya se comentó anteriormente, el manejo de los animales se limita a una captura anual en la que se recuenta el número de ejemplares y se registran los potros nuevos. Al comparar los datos recogidos con el archivo histórico, es muy común que varios animales ya inscritos en años anteriores no aparezcan en esta nueva lista. Existen dos posibilidades: que un animal haya causado baja por muerte o que no haya sido capturado, siendo muy probable que vuelva a aparecer en el censo del año siguiente. Si se tiene en cuenta que su comportamiento es gregario, será más de un animal el que escape del recuento, causando un descenso de varios individuos en el censo de ese año y un aumento en el del siguiente.

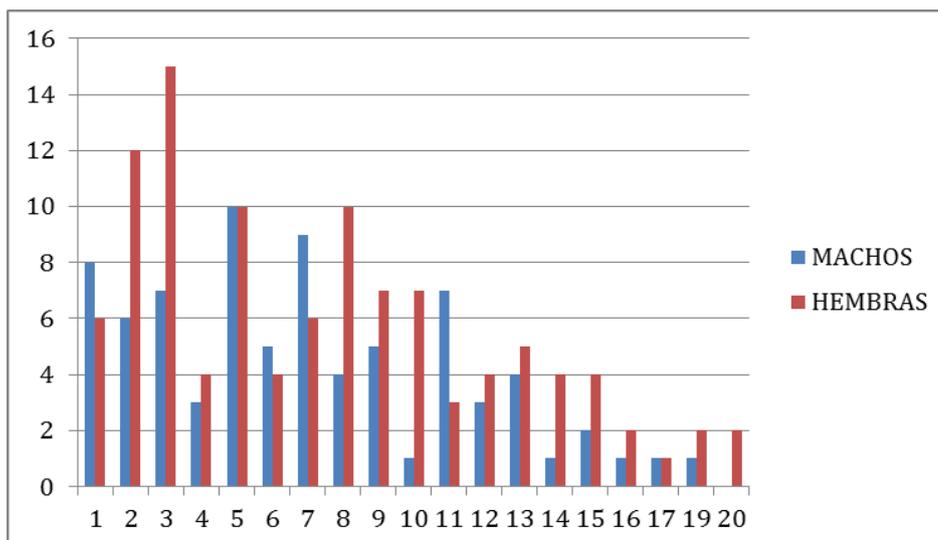


Gráfico 2: Pirámide de edades de ejemplares de las Retuertas distribuidas por edades y sexo

El estudio demográfico incluye los principales parámetros demográficos. Además, se comparan otras dos razas: El Caballo Hispano-Árabe y el Caballo Marismeño, por ser dos razas autóctonas de reducido censo. Se obtienen los siguientes resultados (Tabla 8):

El ratio sexual es de 1,38, lo que implica que hay 1,38 hembras por cada semental; cifra muy equilibrada en comparación con la mayoría de razas equinas en las que esta cifra se dispara debido al uso de la inseminación artificial. Este equilibrio entre el número de machos y hembras se ve reflejado en el tamaño efectivo de la población (181,16), el cual se aproxima bastante al tamaño real (199). El intervalo generacional, definido como la edad de los animales cuando sus hijos han tenido descendencia, es muy similar al de otras razas equinas, ocurriendo lo mismo con la tasa de reposición. Cabe resaltar el incremento de consanguinidad por generación (0,28%) por ser una cifra excesivamente elevada y preocupante. Este parámetro es uno de los más representativos e importantes ya que refleja la salud genética de la población. En este caso, por tratarse de la especie equina, con un intervalo generacional tan elevado, el incremento de la consanguinidad por año se rebaja hasta (0,03%).

Tabla 8. Parámetros demográficos de tres razas equinas españolas: caballo de las Retuertas, Caballo Hispano-Árabe (H-Á) y caballo marismeño

CONCEPTO	RETUERTAS	H-Á	MARISMEÑO
N	186	1041	252
Ne	181,16	1036,94	91,00
Ratio Sexual	1/1,38	1/1,13	1/9,80
L _h	7,49	8,95	8,70
L _m	6,97	8,31	5,96
L _t	7,27	8,65	8,40
t _h	5,56%	13,00%	9,80%
t _m	10,26%	12,00%	36,00%
t _t	7,53%	12,00%	12,30%
ΔF _{por generación}	0,28%	0,05%	0,54%
ΔF _{por año}	0,04%	0,01%	0,06%

¹N=Tamaño de la población actual; N_e=Tamaño efectivo de la población; L_h=Intervalo generacional de las hembras, L_m=Intervalo generacional de los machos, L_t=Intervalo generacional del total de la población t =tasa de reposición; ΔF=Incremento de la consanguinidad.H-Á=Hispanoárabe.

Atendiendo a los datos obtenidos anualmente, de media, los coeficientes de consanguinidad se estabilizan alrededor de 0,13; sin embargo, ya se empiezan a encontrar ejemplares con consanguinidades superiores a 0,20 (Gráfico 3), redundando este dato en la necesidad urgente de crear un programa de conservación que controle el incremento de consanguinidad.



Gráfico 3. Evolución de los coeficientes de consanguinidad.

Se identifican un total de 13 fundadores, entendiéndose éstos como los primeros individuos de la raza que se inscribieron en el registro demográfico y que no disponen de información genealógica de

sus antecesores. El semental denominado CERO contribuye, él sólo, a la variabilidad genética de la raza en un 34%. (Gráfico 4). Se calcula, igualmente, el número efectivo de fundadores (f_e) y de ancestros (f_a) siendo, obteniéndose, en ambos casos, un valor de 5 individuos.

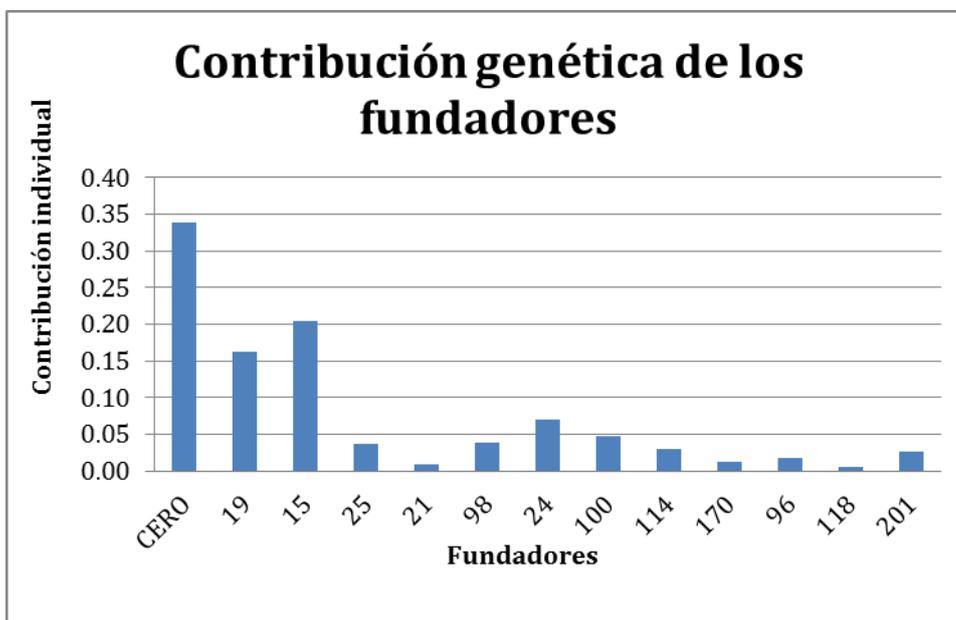


Gráfico 4. Contribución genética de los fundadores

Además, cinco de esos 13 fundadores acumulan más del 90% de la variabilidad genética de la población y solo dos de ellos, el 50%. (Gráfico 5)

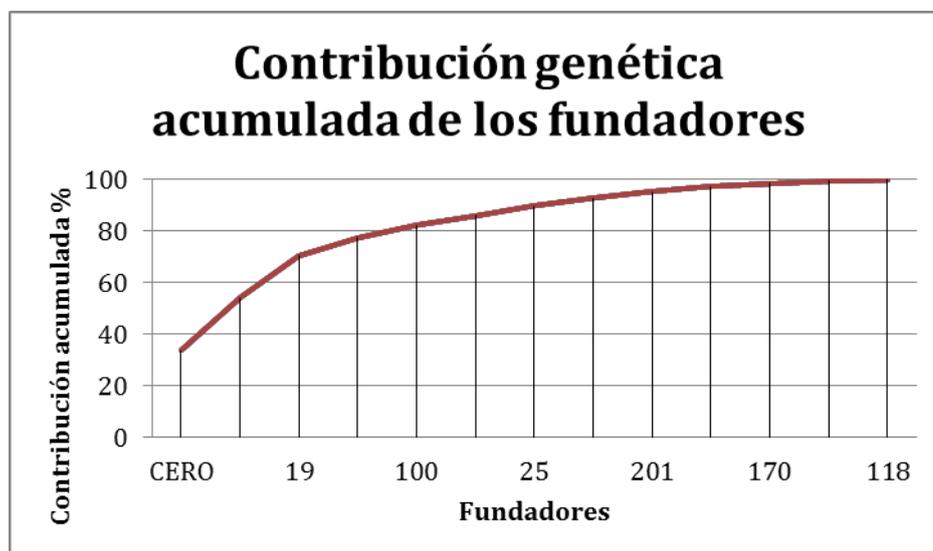


Gráfico 5. Contribución genética acumulada de los fundadores.

En el Caballo de las Retuertas, más del 90% de los individuos tienen padres conocidos y más del 70%, abuelos (Imagen 7). Además, existen seis generaciones conocidas, denominadas generaciones máximas; aunque tan sólo las tres últimas son generaciones completas.

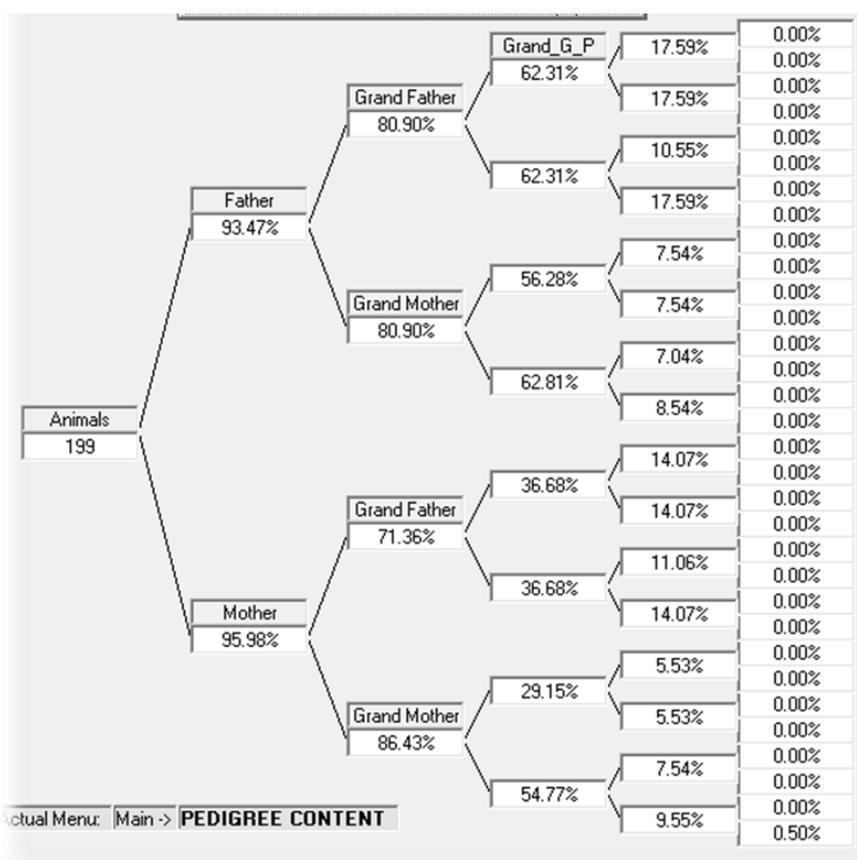


Imagen 7. Porcentaje de ancestros conocidos en el caballo de las Retuertas. Animals=Animales, Father=Padre, Mother=Madre, Grand Father=Abuelo, Grand Mother=Abuela

Atendiendo a la consanguinidad media (*Fmedia*) en cada una de las generaciones máximas (Tabla 9), se observa cómo va aumentando hasta 13, 19 en la sexta generación, siendo la media de parentesco de 29,06%.

Tabla 9. Consanguinidad media por generaciones máximas

Generación	Nº Animales	F media (%)	Consanguíneos (%)	F media de consanguíneos (%)	Media de Parentesco (%)
0	8	0,00			11,10
1	11	0,00			18,30
2	31	3,23	25,81	12,50	24,66
3	84	10,27	91,67	11,20	29,04
4	49	13,74	87,76	15,66	28,97
5	7	9,32	100	9,32	27,95
6	9	13,19	100	13,19	29,06

En cambio, cuando se consideran generaciones completas la consanguinidad asciende a 17% y la media de parentesco a 32, 13% (Tabla 10).

Tabla 10. Consanguinidad media por generaciones completas

Generación	Nº Animales	F media (%)	Consanguíneos (%)	F media de consanguíneos (%)	Media de Parentesco (%)
0	13	0,00			10,73
1	57	1,86	28,07	6,64	22,33
2	102	12,30	99,02	12,42	30,30
3	27	17,00	100,00	17,00	32,13

Con respecto al intervalo generacional (Tabla 11) en cada una de las cuatro rutas posibles (padre-hijo, padre-hija, madre-hijo y madre-hija), las cifras se ajustan a las encontradas en otras razas de la especie equina.

Tabla 11. Intervalo generacional (Media, desviación estándar y error estándar) para las cuatro rutas progenitor-descendencia

Rutas	N	Edad (media ± SD)	EE
Padre-hijo	17	8,06±2,54	±0,62
Padre-hija	48	9,71±2,49	±0,60
Madre-hijo	17	9,29±6,52	±1,58
Madre-hija	53	9,28±4,94	±1,20
Total	135	9,28±4,21	±0,36

N=Tamaño de la muestra, SD=Desviación estándar, EE=Error estándar

Se calculan, igualmente, los parámetros de variabilidad genética y de endogamia (Tabla 12) y se comparan con dos razas equinas. Una de ellas es el caballo Hucul, de origen polaco. Se compara con esta población por compartir ciertas características como son un reducido censo, una alta rusticidad o el hecho de encontrarse también en peligro de extinción. La tercera raza comparada es el caballo pura raza español, por compartir un mismo origen genético.

Tabla 12. Parámetros de variabilidad genética y endogamia en el Caballo de las Retuertas comparados con otras dos razas equinas (Hucul y Pura Raza Español).

CONCEPTO1	RETUERTAS	HUCUL	PRE
N	186	158	70.396
Nº FUNDADORES	13	134	1465
fe	5	26	39,6
Nº ANCESTROS	12	46	331
fa	5	16	16,5
F	9,78%	6,26%	9,08%
AR	27,78%	9,34%	13,01%
ΔF	0,077	1,01	-
N_e	181,16	47,67	-
Nº generaciones máximas	6	17,5	15,37
Nº generaciones equivalentes completas	3	7,10	8,72

N=Tamaño de la población actual; fe=Nº efectivo de fundadores; fa=Nº efectivo de ancestros; F=Consanguinidad individual; AR=Coeficiente de relación promedio; ΔF =Tasa de consanguinidad N_e =Tamaño efectivo de la población, PRE=Pura raza española

Finalmente, y con toda la información genealógica y genética, se reconstruye el árbol genealógico de la raza, el cual consta de 199 ejemplares y 4 generaciones efectivas (Figura 5). En este caso, se excluyen aquellos animales no fundadores que no disponen de una genealogía fiable ni contrastada genéticamente.

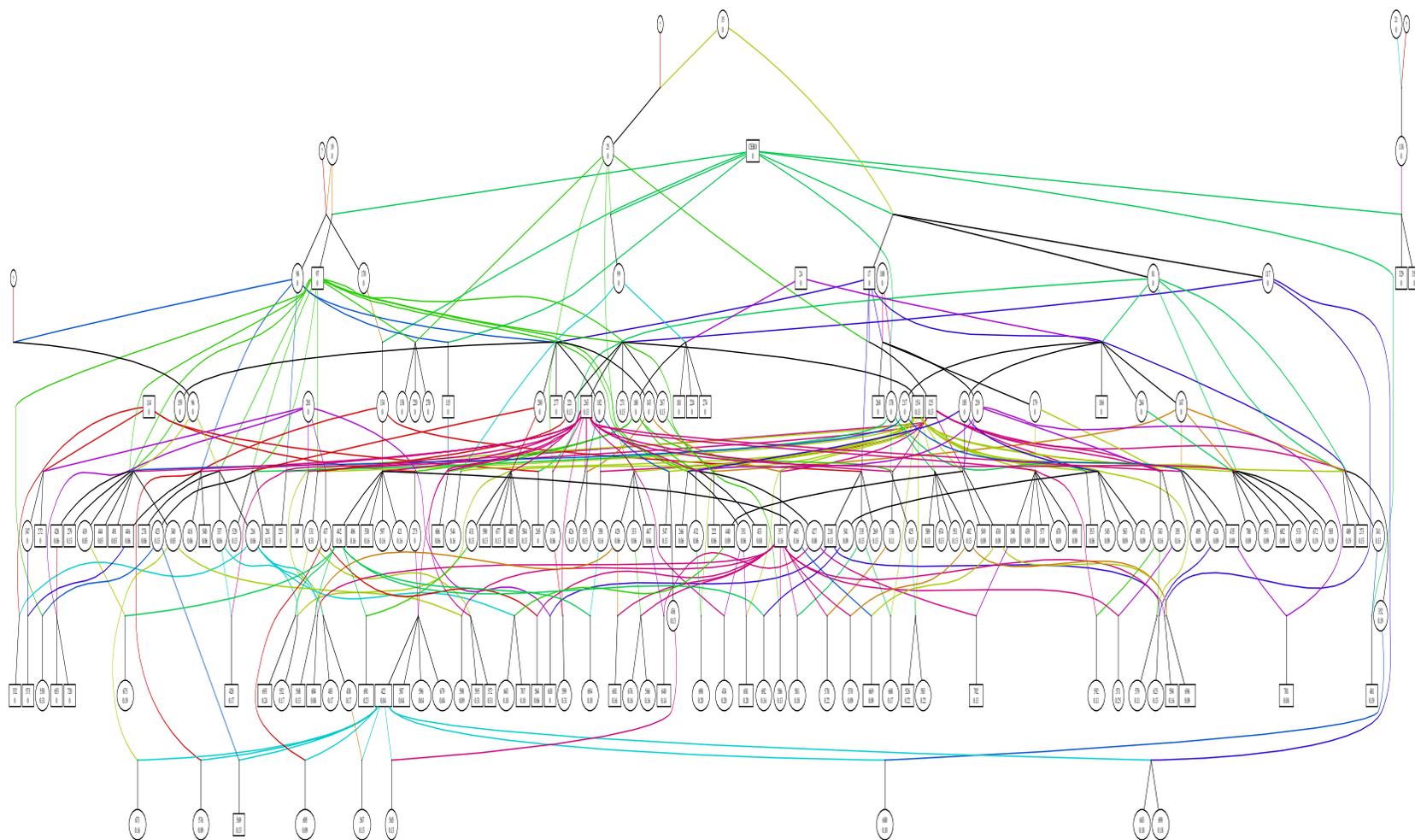


Figura 5. Árbol genealógico del caballo de Las Retuertas de Doñana: 199 ejemplares y 4 generaciones efectivas. ○=MACHO, □=HEMBRA. La numeración dentro de las figuras hace referencia al grado de consanguinidad.

4.2 RESULTADOS DE LA CARACTERIZACIÓN SEMINAL

4.2.1 Estadísticos descriptivos y dispersión de las variables seminales para el conjunto de sementales

En el análisis estadístico descriptivo de las variables seminales para el conjunto de Sementales (Tabla 13), el valor medio (media±desviación estándar) del *Volumen* es 23,25±12,72 ml; de la *Concentración* 309,34±149,55 x10⁶ espermatozoides/ml; de la *Motilidad Progresiva*, 59%±16% (%) y de la *Motilidad Masal*, 3,84±0,98 (1-5). El *Coefficiente de Variación* para el *Volumen* es 54,71%; de la *Concentración*, 48,34%; de la *Motilidad Masal*, 25,62%; y de la *Motilidad Progresiva*, 26,97%.

Tabla 13. Estadísticos descriptivos y dispersión de las variables seminales para el conjunto de sementales

Variable	N	Media	DE	MIN	MAX	CV
Volumen	94	23,25	12,72	5,00	53,00	54,71
Concentración	79	309,34	149,55	1,00	659,00	48,34
Motilidad Masal	40	3,84	0,98	1,00	5,00	25,62
Motilidad Progresiva	82	59	16	10	90	26,97

Volumen = volumen de semen (ml). *Concentración* = N^o de espermatozoides x 10⁹/ml de semen. *Motilidad masal* (1-5). *Motilidad progresiva* (%). N = número de observaciones. DE= Desviación estándar. Min= valor mínimo. Max= Valor máximo. CV = Coeficiente de variación (%).

Además, se realiza el análisis estadístico descriptivo de las variables seminales para cada uno de los sementales (Tablas 14, 15, 16 y 17)

Tabla 14. Estadísticos descriptivos y dispersión de las variables seminales para el semental 1.

Variable	N	Media	DE	MIN	MAX	CV
Volumen	25	16,70	10,43	5,00	50,00	62,47
Concentración	22	354,55	142,97	70,00	630,00	40,33
Motilidad Masal	10	4,00	0,67	3,00	5,00	16,67
Motilidad Progresiva	21	60	12	35	75	20,39

Volumen = volumen de semen (ml). *Concentración* = N^o de espermatozoides x 10⁹/ml de semen. *Motilidad masal* (1-5). *Motilidad progresiva* (%). N = número de observaciones. DE= Desviación estándar. Min= valor mínimo. Max= Valor máximo. CV = Coeficiente de variación (%).

Tabla 15. Estadísticos descriptivos y dispersión de las variables seminales para el semental 2.

Variable	N	Media	DE	MIN	MAX	CV
Volumen	18	32,73	14,08	10,00	53,00	43,01
Concentración	15	260,53	113,32	1,00	483,00	43,50
Motilidad Masal	9	4,00	0,83	3,00	5,00	20,73
Motilidad Progresiva	17	66	19	30	90	28,21

Volumen = volumen de semen (ml). Concentración = N^o de espermatozoides x 10⁹/ml de semen. Motilidad masal (1-5). Motilidad progresiva (%). N = número de observaciones. DE= Desviación estándar. Min= valor mínimo. Max= Valor máximo. CV = Coeficiente de variación (%).

Tabla 16. Estadísticos Descriptivos y Dispersión de las Variables Seminales para el semental 3.

Variable	N	Media	DE	MIN	MAX	CV
Volumen	23	18,43	8,30	5,00	35,00	45,03
Concentración	23	222,62	105,46	58,20	437,00	47,37
Motilidad Masal	10	2,80	1,09	1	4,50	38,76
Motilidad Progresiva	23	48	17	10	70	36,02

Volumen = volumen de semen (ml). Concentración = N^o de espermatozoides x 10⁹/ml de semen. Motilidad masal (1-5). Motilidad progresiva (%). N = número de observaciones. DE= Desviación estándar. Min= valor mínimo. Max= Valor máximo. CV = Coeficiente de variación (%).

Tabla 17. Estadísticos Descriptivos y Dispersión de las Variables Seminales para el semental 4.

Variable	N	Media	DE	MIN	MAX	CV
Volumen	28	26,96	12,08	9,00	50,00	44,79
Concentración	27	373,48	164,65	100,00	659,00	44,08
Motilidad Masal	11	4,50	0,39	3,50	5,00	8,61
Motilidad Progresiva	27	64	10	45	80	15,96

Volumen = volumen de semen (ml). Concentración = N^o de espermatozoides x 10⁹/ml de semen. Motilidad masal (1-5). Motilidad progresiva (%). N = número de observaciones. DE= Desviación estándar. Min= valor mínimo. Max= Valor máximo. CV = Coeficiente de variación (%).

4.2.2 Análisis unifactorial simple del factor seminal sobre las variables seminales estudiadas

Al realizar el Análisis Unifactorial Simple del Factor Seminal sobre las variables (Tabla 18), se obtiene que para el *Volumen* y *Concentración*. $Pr>F$ es $<0,0001$; mientras que para la *Motilidad Masal*. $Pr>F$ es 0,0001 y 0,0010 para la *Motilidad Progresiva*.

Tabla 18. Análisis Unifactorial Simple del Factor Seminal sobre las Variables Seminales Estudiadas.

VARIABLES	GL	Valores F	Pr>F	R ²
Volumen	3	9,47	<0,0001	0,24
Concentración	3	6,47	<0,05	0,19
Motilidad Masal	3	8,94	<0,0001	0,43
Motilidad Progresiva	3	6,88	<0,05	0,20

GL = Grados de libertad. R² = Coeficiente de determinación. Volumen = volumen de semen (ml). Concentración = N^o de espermatozoides x 10⁹/ml de semen. Mm = Motilidad masal (1-5). Mp = Motilidad progresiva (%). Separación de medias *a posteriori* para el Volumen y para la Concentración

Se estudian las separaciones de la media *a posteriori* para cada variable y se representan en un gráfico donde cada columna corresponde a un seminal. Para el *Volumen* (Gráfico 6). hay dos grupos de homogeneidad: uno para los seminales 1 y 2 y otro para el 3 y el 4. Para la *Concentración* (Gráfico 7), existen igualmente, dos grupos. Para la *Motilidad Masal* (Gráfico 8) y *Progresiva* (Gráfico 9). existe un grupo de homogeneidad entre los seminales 1. 2 y 4. quedando el 3 fuera de ese grupo.

Gráfico 6. Separación de medias a posteriori para el Volumen

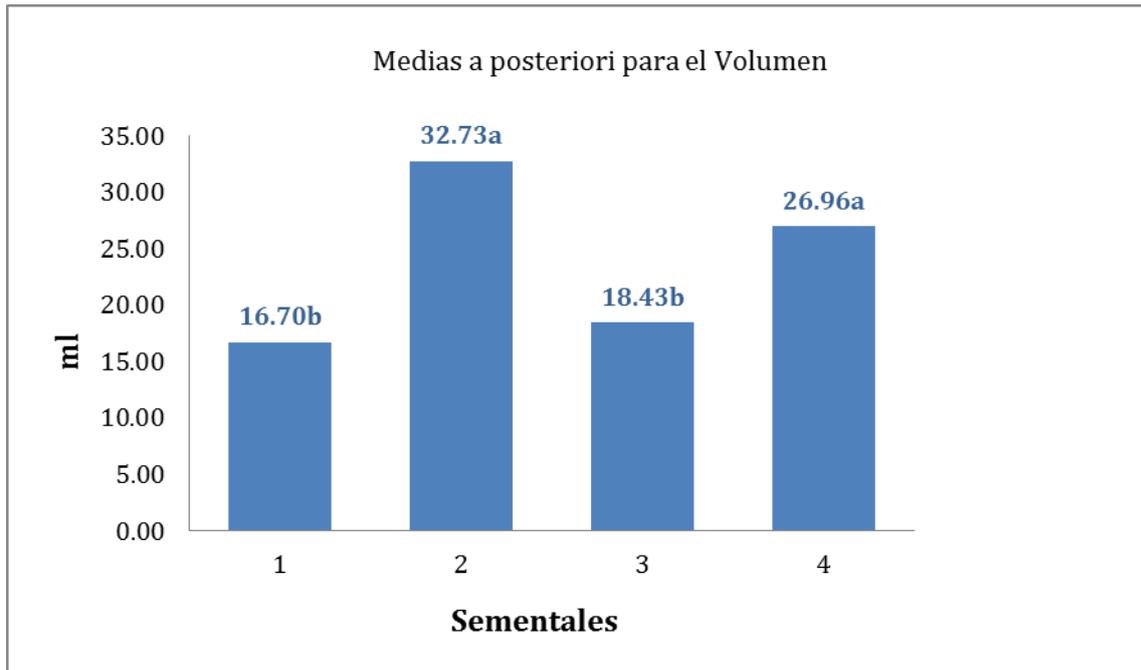
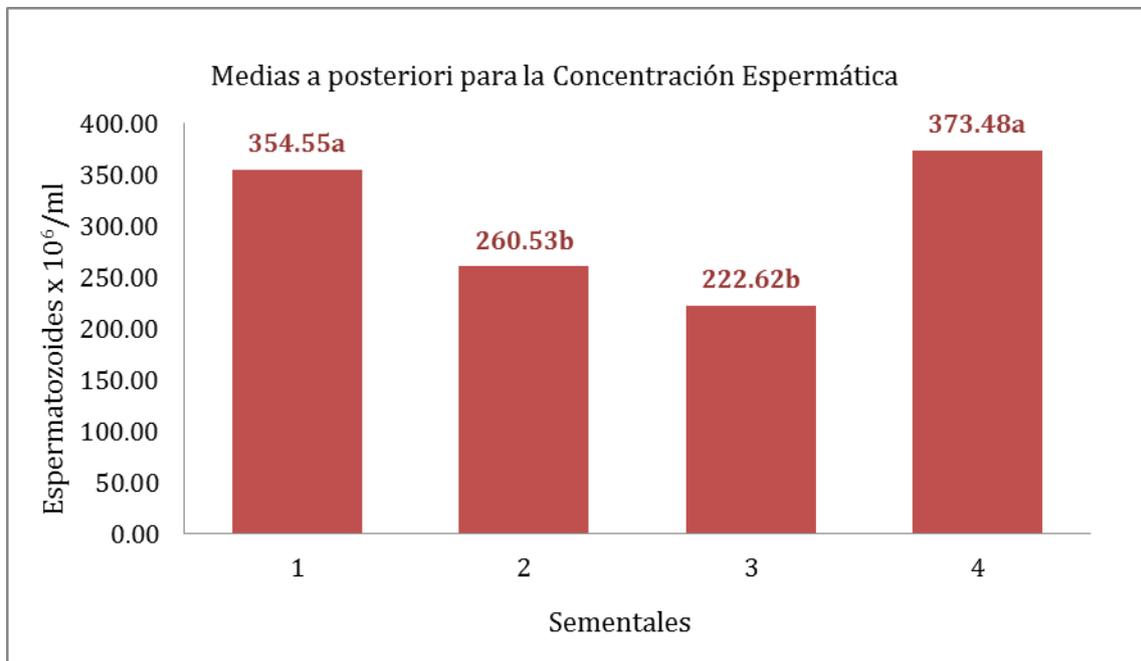


Gráfico 7. Separación de medias a posteriori para la Concentración Espermática



4.2.3 Separación de medias a posteriori para la Motilidad Masal y separación de medias a posteriori para la Motilidad Progresiva

Gráfico 8. Separación de medias a posteriori para la Motilidad Masal

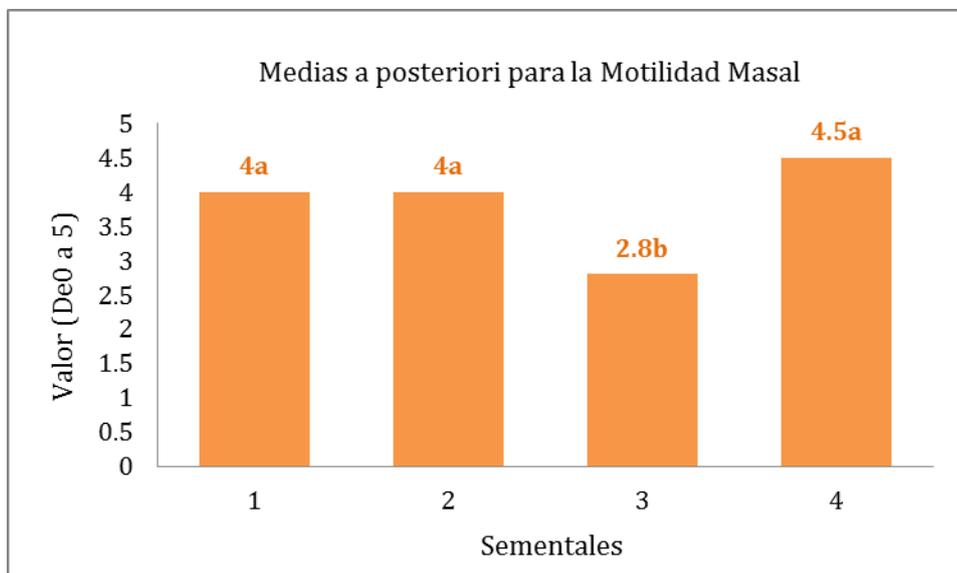
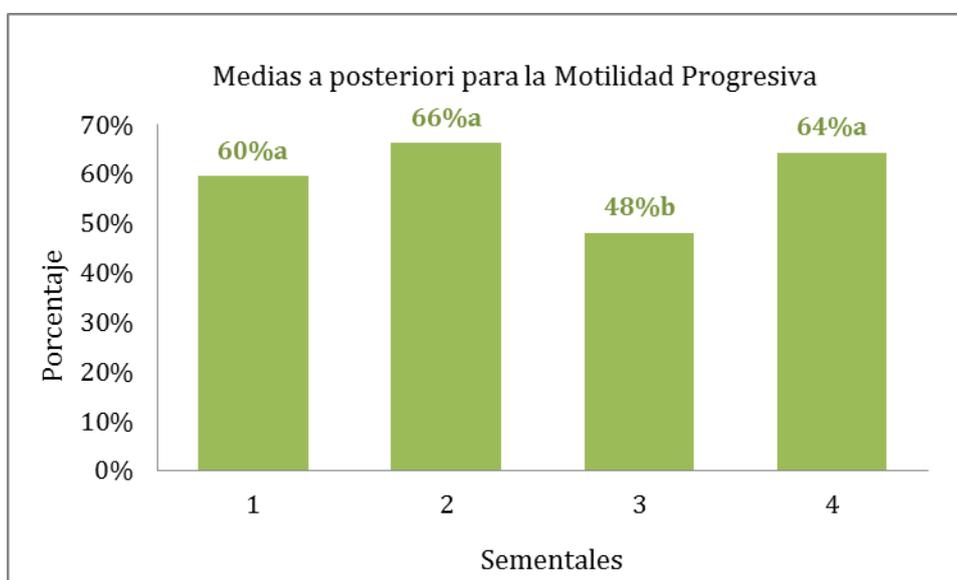


Gráfico 9. Separación de medias a posteriori para la Motilidad Progresiva



Las medias, en cada columna, con la misma letra no presentan diferencias. Cada columna representa a cada uno de los sementales, numerados del 1 al 4.

4.2.4 Estimación objetiva del estado de conservación del banco de germoplasma mediante citómetro de flujo

Para cada una de las muestras analizadas se obtiene un cuadrante (Figura 6) en el que se separan las siguientes subpoblaciones:

- Espermatozoides con apoptosis tardía. Cuadrante E1
- Espermatozoides necróticos. Cuadrante E2
- Espermatozoides vivos. Cuadrante E3
- Espermatozoides con apoptosis temprana. Cuadrante E4

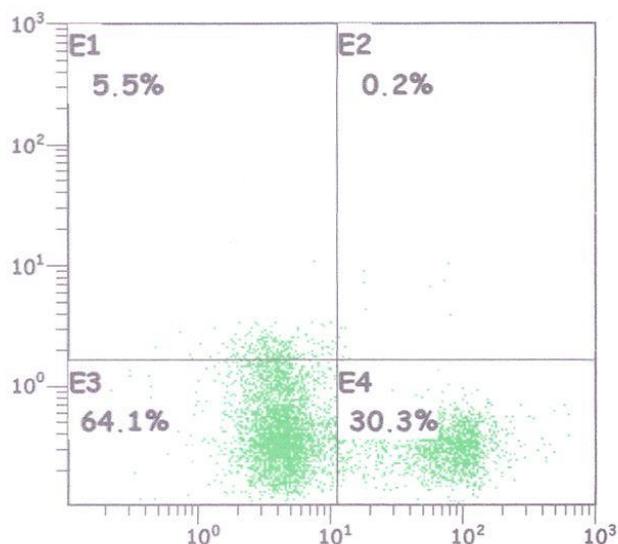


Figura 6. Cuadrantes de las sub-poblaciones espermáticas sometidas a tinciones dobles de Yoduro de Propidio y Hemodímero de Etidio.

4.2.5 Estimación objetiva del estado de conservación del banco de germoplasma mediante sistema CASA

Se estudian las siguientes variables

- Velocidad Curvilínea (VCL): Distancia total recorrida por la cabeza del espermatozoide a lo largo de su trayectoria real por unidad de tiempo ($\mu\text{m/s}$). (Imagen 8)
- Velocidad Rectilínea (VSL): Se determina a partir de la distancia en línea recta entre el primer y último punto de su trayectoria. y da la ganancia de espacio neto en el período de observación. medida en unidad de tiempo ($\mu\text{m/s}$).
- Velocidad Media (VAP): Distancia recorrida por el espermatozoide a lo largo de la trayectoria media de circulación en el periodo de observación. Esto es. conceptualmente. el valor de la velocidad más difícil de entender porque podría parecer que debería ser similar a la VSL.
- Índice de linealidad (LIN): Es la relación porcentual entre la velocidad rectilínea y la velocidad curvilínea.

$$\text{LIN} = (\text{VSL}/\text{VCL}) \times 100.$$

- Índice de rectitud (STR): Es la relación porcentual entre la velocidad rectilínea y la velocidad media.

$$\text{STR} = (\text{VSL}/\text{VAP}) \times 100.$$

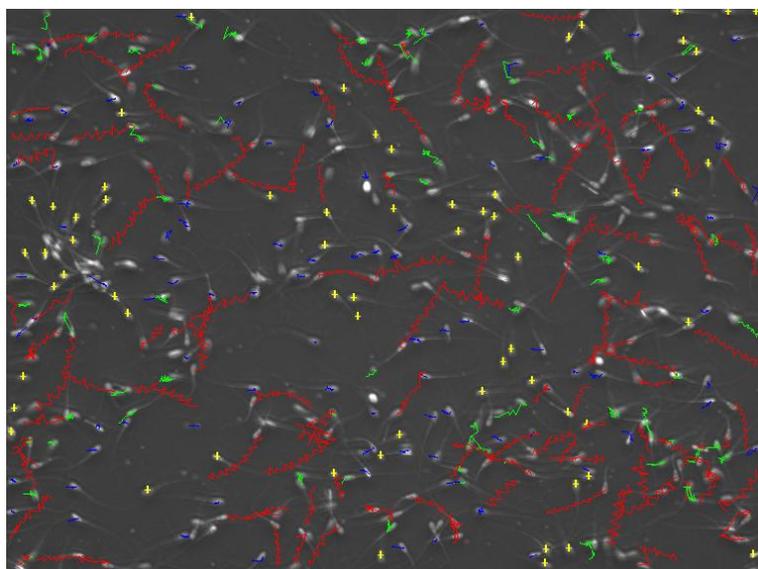


Imagen 8. Obtenida del análisis de la motilidad. Según su velocidad, los espermatozoide marcados en rojo son los rápidos, los marcados en amarillo son los estáticos, los marcados en verde son los medios y los marcados en azul son los lentos.

Los resultados obtenidos para el conjunto de los datos se ponen de manifiesto en la tabla 19. En ella resalta el importante nivel de variabilidad observada para la mayoría de las variables estudiadas, lo que pone de manifiesto diferencias importantes en las condiciones del semen criopreservado. Estas diferencias pueden ser debidas a la variabilidad observada en el estudio descriptivo del semen en fresco; aunque, por otra parte, también podrían ser debidas a diferentes grados de susceptibilidad del espermatozoide de los distintos sementales o de los diferentes diluyentes al proceso de congelación.

Tabla 19. Estadísticos descriptivos y dispersión de las variables seminales en el semen descongelado para el conjunto de sementales y diluyentes.

VARIABLE	MEDIA	SD	MIN	MAX	CV
VIVOS	0,25	0,10	0,07	0,48	40,22
APOPTEMP	0,36	0,14	0,07	0,64	39,11
APOPTARD	0,26	0,08	0,10	0,44	31,33
NECROTICOS	0,09	0,05	0,00	0,24	59,81
VCL	36,32	8,04	16,17	50,62	22,13
VSL	13,96	3,13	6,73	19,89	22,40
VAP	19,75	4,79	0,00	31,65	24,23
LIN	39,92	4,94	26,42	59,14	12,36
STR	71,86	8,62	0,00	80,64	12,00

ANÁLISIS DEMOGRÁFICO Y CARACTERIZACIÓN SEMINAL DEL CABALLO DE LAS RETUERTAS DE DOÑANA

VIVOS=Subpoblación de espermatozoides vivos. APOPTEMP=Subpoblación de espermatozoides que sufre una apoptosis temprana. APOPTARD=Subpoblación de espermatozoides que sufre una apoptosis tardía. NECROTICOS=Subpoblación de espermatozoides en estado de necrosis. VCL=Velocidad curvilínea. VSL=Velocidad rectilínea. VAP=Velocidad media. LIN=Índice de linealidad. STR=Índice de rectitud. SD=Desviación estándar. MIN=Valor mínimo. MAX=Valor máximo. CV=Coficiente de variación

Además de analizar los datos en conjunto, se realiza un estudio de los estadísticos descriptivos y de dispersión para cada semental y cada diluyente (Tablas 20- 28). En cada una de las variables se observa, igualmente, un elevado coeficiente de variación.

Tabla 20. Estadísticos descriptivos y dispersión de las variables seminales en el semen descongelado para el semental 1.

VARIABLE	MEDIA	DE	MIN	MAX	CV
VIVOS	0,24	0,10	0,08	0,46	43,39
APOPTEMP	0,35	0,15	0,07	0,62	41,73
APOPTARD	0,27	0,07	0,13	0,42	24,96
NECROTICOS	0,10	0,06	0,03	0,24	60,13
VCL	38,43	8,20	16,17	50,08	21,33
VSL	14,95	2,75	7,08	19,89	18,38
VAP	20,44	5,85	0,00	31,65	28,65
LIN	40,37	4,36	34,17	51,30	10,80
STR	70,15	14,78	0,00	78,94	21,07

VIVOS=Subpoblación de espermatozoides vivos. APOPTEMP=Subpoblación de espermatozoides que sufre una apoptosis temprana. APOPTARD=Subpoblación de espermatozoides que sufre una apoptosis tardía. NECROTICOS=Subpoblación de espermatozoides en estado de necrosis. VCL=Velocidad curvilínea. VSL=Velocidad rectilínea. VAP=Velocidad media. LIN=Índice de linealidad. STR=Índice de rectitud. SD=Desviación estándar. MIN=Valor mínimo. MAX=Valor máximo. CV=Coficiente de variación

Tabla 21. Estadísticos descriptivos y dispersión de las variables seminales en el semen descongelado para el semental 2.

VARIABLE	MEDIA	DE	MIN	MAX	CV
VIVOS	0,24	0,09	0,07	0,45	39,06
APOPTEMP	0,43	0,12	0,19	0,64	29,03
APOPTARD	0,22	0,08	0,10	0,43	38,74
NECROTICOS	0,09	0,05	0,02	0,22	57,16
VCL	37,37	7,79	21,40	50,62	20,84
VSL	14,43	2,81	8,51	18,55	19,45
VAP	20,61	4,35	12,31	29,37	21,08
LIN	39,77	3,68	32,17	49,05	9,26
STR	72,37	4,22	63,83	80,56	5,83

VIVOS=Subpoblación de espermatozoides vivos. APOPTEMP=Subpoblación de espermatozoides que sufre una apoptosis temprana. APOPTARD=Subpoblación de espermatozoides que sufre una apoptosis tardía. NECROTICOS=Subpoblación de espermatozoides en estado de necrosis. VCL=Velocidad curvilínea. VSL=Velocidad rectilínea. VAP=Velocidad media. LIN=Índice de linealidad. STR=Índice de rectitud. SD=Desviación estándar. MIN=Valor mínimo. MAX=Valor máximo. CV=Coficiente de variación

Tabla 22. Estadísticos descriptivos y dispersión de las variables seminales en el semen descongelado para el semental 3.

VARIABLE	MEDIA	DE	MIN	MAX	CV
VIVOS	0,28	0,11	0,10	0,48	38,71
APOPTEMP	0,27	0,10	0,08	0,53	38,03
APOPTARD	0,31	0,06	0,16	0,44	21,01
NECROTICOS	0,10	0,05	0,04	0,21	48,39
VCL	30,21	7,01	17,52	42,98	23,22
VSL	11,44	2,92	6,73	17,25	25,55
VAP	16,32	3,29	10,51	23,21	20,18
LIN	39,59	7,64	26,42	59,14	19,31
STR	72,35	4,73	60,70	80,64	6,54

VIVOS=Subpoblación de espermatozoides vivos. APOPTEMP=Subpoblación de espermatozoides que sufre una apoptosis temprana. APOPTARD=Subpoblación de espermatozoides que sufre una apoptosis tardía. NECROTICOS=Subpoblación de espermatozoides en estado de necrosis. VCL=Velocidad curvilínea. VSL=Velocidad rectilínea. VAP=Velocidad media. LIN=Índice de linealidad. STR=Índice de rectitud. SD=Desviación estándar. MIN=Valor mínimo. MAX=Valor máximo. CV=Coefficiente de variación

Tabla 23. Estadísticos descriptivos y dispersión de las variables seminales en el semen descongelado para el semental 4.

VARIABLE	MEDIA	DE	MIN	MAX	CV
VIVOS	0,24	0,09	0,10	0,43	38,21
APOPTEMP	0,42	0,14	0,14	0,62	33,56
APOPTARD	0,25	0,09	0,11	0,44	35,92
NECROTICOS	0,07	0,05	0,00	0,21	75,07
VCL	38,64	6,21	24,42	50,47	16,08
VSL	15,16	2,60	10,33	19,21	17,15
VAP	21,25	3,34	15,23	27,24	15,72
LIN	39,92	3,12	34,85	45,76	7,81
STR	72,89	4,17	66,48	80,55	5,71

VIVOS=Subpoblación de espermatozoides vivos. APOPTEMP=Subpoblación de espermatozoides que sufre una apoptosis temprana. APOPTARD=Subpoblación de espermatozoides que sufre una apoptosis tardía. NECROTICOS=Subpoblación de espermatozoides en estado de necrosis. VCL=Velocidad curvilínea. VSL=Velocidad rectilínea. VAP=Velocidad media. LIN=Índice de linealidad. STR=Índice de rectitud. SD=Desviación estándar. MIN=Valor mínimo. MAX=Valor máximo. CV=Coefficiente de variación

Tabla 24 Estadísticos descriptivos y dispersión de las variables seminales en el semen descongelado para el diluyente 1.

VARIABLE	MEDIA	DE	MIN	MAX	CV
VIVOS	0,32	0,09	0,18	0,48	29,00
APOPTEMP	0,30	0,12	0,07	0,60	39,67
APOPTARD	0,22	0,07	0,11	0,41	31,60
NECROTICOS	0,13	0,06	0,03	0,22	43,67
VCL	37,13	10,24	16,17	50,62	27,59
VSL	14,23	3,55	7,08	19,20	24,92
VAP	20,58	7,21	0,00	31,65	35,04
LIN	42,78	5,19	36,51	54,13	12,14
STR	68,72	19,06	0,00	79,58	27,73

VIVOS=Subpoblación de espermatozoides vivos. APOPTEMP=Subpoblación de espermatozoides que sufre una apoptosis temprana. APOPTARD=Subpoblación de espermatozoides que sufre una apoptosis tardía. NECROTICOS=Subpoblación de espermatozoides en estado de necrosis. VCL=Velocidad curvilínea. VSL=Velocidad rectilínea. VAP=Velocidad media. LIN=Índice de linealidad. STR=Índice de rectitud. SD=Desviación estándar. MIN=Valor mínimo. MAX=Valor máximo. CV=Coficiente de variación

Tabla 25. Estadísticos Descriptivos y Dispersión de las Variables Seminales en el semen descongelado para el diluyente 2.

VARIABLE	MEDIA	DE	MIN	MAX	CV
VIVOS	0,21	0,08	0,11	0,35	36,50
APOPTEMP	0,40	0,18	0,08	0,64	45,80
APOPTARD	0,25	0,07	0,13	0,42	29,44
NECROTICOS	0,08	0,05	0,02	0,23	64,39
VCL	34,42	6,31	21,40	43,45	18,35
VSL	12,43	2,65	6,73	17,25	21,32
VAP	18,32	3,17	11,42	22,33	17,29
LIN	37,92	6,87	26,42	59,14	18,12
STR	69,27	4,79	60,70	80,64	6,92

VIVOS=Subpoblación de espermatozoides vivos. APOPTEMP=Subpoblación de espermatozoides que sufre una apoptosis temprana. APOPTARD=Subpoblación de espermatozoides que sufre una apoptosis tardía. NECROTICOS=Subpoblación de espermatozoides en estado de necrosis. VCL=Velocidad curvilínea. VSL=Velocidad rectilínea. VAP=Velocidad media. LIN=Índice de linealidad. STR=Índice de rectitud. SD=Desviación estándar. MIN=Valor mínimo. MAX=Valor máximo. CV=Coficiente de variación

Tabla 27. Estadísticos Descriptivos y Dispersión de las Variables Seminales en el semen descongelado para el diluyente 3.

VARIABLE	MEDIA	DE	MIN	MAX	CV
VIVOS	0,25	0,10	0,10	0,47	39,85
APOPTEMP	0,37	0,12	0,18	0,58	33,64
APOPTARD	0,29	0,08	0,12	0,44	27,42
NECROTICOS	0,08	0,05	0,00	0,22	66,28
VCL	38,96	6,52	23,56	50,08	16,73
VSL	15,53	2,68	9,84	19,89	17,29
VAP	20,63	4,05	11,84	28,30	19,63
LIN	40,46	2,87	33,70	46,33	7,10
STR	74,96	3,01	69,79	80,56	4,02

VIVOS=Subpoblación de espermatozoides vivos. APOPTEMP=Subpoblación de espermatozoides que sufre una apoptosis temprana. APOPTARD=Subpoblación de espermatozoides que sufre una apoptosis tardía. NECROTICOS=Subpoblación de espermatozoides en estado de necrosis. VCL=Velocidad curvilínea. VSL=Velocidad rectilínea. VAP=Velocidad media. LIN=Índice de linealidad. STR=Índice de rectitud. SD=Desviación estándar. MIN=Valor mínimo. MAX=Valor máximo. CV=Coefficiente de variación

Tabla27. Estadísticos Descriptivos y Dispersión de las Variables Seminales en el semen descongelado para el diluyente 4.

VARIABLE	MEDIA	DE	MIN	MAX	CV
VIVOS	0,22	0,08	0,08	0,44	38,42
APOPTEMP	0,40	0,14	0,18	0,59	33,86
APOPTARD	0,28	0,09	0,12	0,44	30,83
NECROTICOS	0,08	0,04	0,02	0,15	49,56
VCL	35,91	7,34	18,38	48,88	20,46
VSL	13,76	2,85	6,99	18,28	20,74
VAP	19,45	3,43	12,28	27,12	17,61
LIN	38,56	4,15	31,02	51,30	10,75
STR	72,58	3,63	64,84	77,99	5,00

VIVOS=Subpoblación de espermatozoides vivos. APOPTEMP=Subpoblación de espermatozoides que sufre una apoptosis temprana. APOPTARD=Subpoblación de espermatozoides que sufre una apoptosis tardía. NECROTICOS=Subpoblación de espermatozoides en estado de necrosis. VCL=Velocidad curvilínea. VSL=Velocidad rectilínea. VAP=Velocidad media. LIN=Índice de linealidad. STR=Índice de rectitud. SD=Desviación estándar. MIN=Valor mínimo. MAX=Valor máximo. CV=Coefficiente de variación

Tabla 28. Estadísticos Descriptivos y Dispersión de las Variables Seminales en el semen descongelado para el diluyente 5.

VARIABLE	MEDIA	DE	MIN	MAX	CV
VIVOS	0,25	0,11	0,07	0,46	45,16
APOPTEMP	0,35	0,12	0,14	0,60	34,91
APOPTARD	0,27	0,08	0,10	0,44	31,90
NECROTICOS	0,09	0,06	0,03	0,24	65,66
VCL	35,05	9,31	17,52	45,88	26,55
VSL	14,16	3,45	8,07	18,73	24,35
VAP	19,81	5,07	10,51	29,71	25,62
LIN	40,86	3,42	35,64	48,88	8,38
STR	73,54	2,97	67,07	78,21	4,03

VIVOS=Subpoblación de espermatozoides vivos. APOPTEMP=Subpoblación de espermatozoides que sufre una apoptosis temprana. APOPTARD=Subpoblación de espermatozoides que sufre una apoptosis tardía. NECROTICOS=Subpoblación de espermatozoides en estado de necrosis. VCL=Velocidad curvilínea. VSL=Velocidad rectilínea. VAP=Velocidad media. LIN=Índice de linealidad. STR=Índice de rectitud. SD=Desviación estándar. MIN=Valor mínimo. MAX=Valor máximo. CV=Coficiente de variación

Posteriormente, se realiza un análisis unifactorial simple para los efectos del factor *Semental* (Tabla 29) y del factor *Diluyente* (Tabla 30) sobre cada una de las variables estudiadas.

Tabla 29. Cuadro resumen de los análisis unifactoriales simples de los efectos del factor Caballo.

VARIABLE	GL	VALORES	NIVEL	R2 %
		DE F	SIGNIFICANCIA	
VIVOS	3	1,49	NS	3,72
APOPTEMP	3	9,18	<0,0001	19,35
APOPTARD	3	7,4	<0,05	16,02
NECROTICOS	3	2,7	<0,05	6,60
VCL	3	7,11	<0,05	17,61
VSL	3	10,65	<0,0001	23,48
VAP	3	5,87	<0,001	15,10
LIN	3	0,17	NS	0,36
STR	3	0,43	NS	1,60

VIVOS=Subpoblación de espermatozoides vivos. APOPTEMP=Subpoblación de espermatozoides que sufre una apoptosis temprana. APOPTARD=Subpoblación de espermatozoides que sufre una apoptosis tardía. NECROTICOS=Subpoblación de espermatozoides en estado de necrosis. VCL=Velocidad curvilínea. VSL=Velocidad rectilínea. VAP=Velocidad media. LIN=Índice de linealidad. STR=Índice de rectitud. GL=Grados de libertad. R²=Coficiente de determinación

Tabla 30. Cuadro resumen de los análisis unifactoriales simples de los efectos del factor diluyente.

	GL	VALORES	NIVEL	R2
		DE F	SIGNIFICANCIA	
VIVOS	4	4,62	<0,05	14,73%
APOPTEMP	4	2,84	NS	7,83%
AOPTARD	4	3,42	NS	9,93%
NECROTICOS	4	4,03	<0,05	13,34%
VCL	4	1,32	NS	4,15%
VSL	4	3,83	<0,05	11,30%
VAP	4	0,95	NS	3,34%
LIN	4	2,94	NS	11,68%
STR	4	1,85	NS	7,92%

VIVOS=Subpoblación de espermatozoides vivos. APOPTEMP=Subpoblación de espermatozoides que sufre una apoptosis temprana. AOPTARD=Subpoblación de espermatozoides que sufre una apoptosis tardía. NECROTICOS=Subpoblación de espermatozoides en estado de necrosis. VCL=Velocidad curvilínea. VSL=Velocidad rectilínea. VAP=Velocidad media. LIN=Índice de linealidad. STR=Índice de rectitud. GL=Grados de libertad. R²=Coeficiente de determinación

Además, se realiza la prueba de homogeneidad de medias a posteriori de las variables que han mostrado una diferencia significativa (>0,05) en el análisis unifactorial aplicado anteriormente, para los dos factores de variación: Caballo (Tabla 31) y Diluyente (Tabla 32). Así, en ambas tablas, la letra que acompaña a cada media indica que, para cada variable existe diferencia significativa entre las razas estudiadas. Las medias de una variable que comparten la misma letra, no son significativamente diferentes.

Tabla 31. Prueba de homogeneidad de medias a posteriori para el factor Caballo.

VARIABLE	SEMENTAL	MEDIA		EE
VIVOS	1	0,24		0,02
	2	0,24		0,02
	3	0,28		0,02
	4	0,25		0,02
APOPTEMP	1	0,35	b	0,02
	2	0,43	a	0,02
	3	0,27	c	0,02
	4	0,42	ab	0,02
AOPTARD	1	0,27	b	0,01
	2	0,22	c	0,01
	3	0,31	a	0,01
	4	0,25	bc	0,01
NECROTICOS	1	0,10	a	0,01
	2	0,09	ab	0,01
	3	0,10	a	0,01

ANÁLISIS DEMOGRÁFICO Y CARACTERIZACIÓN SEMINAL DEL CABALLO DE LAS RETUERTAS DE DOÑANA

VARIABLE	SEMENTAL	MEDIA		EE
	4	0,07	b	0,01
VCL	1	38,56	a	1,39
	2	37,26	a	1,43
	3	30,14	b	1,54
	4	38,58	a	1,54
VSL	1	15,09	a	0,52
	2	14,47	a	0,53
	3	11,51	b	0,53
	4	15,17	a	0,57
VAP	1	20,43	a	0,81
	2	20,64	a	0,87
	3	16,34	b	0,94
	4	21,24	a	0,94
LIN	1	40,60		0,95
	2	40,07		0,97
	3	39,61		1,00
	4	40,13		1,05
STR	1	70,26		1,65
	2	72,35		1,72
	3	72,25		1,78
	4	72,73		1,87

VIVOS=Subpoblación de espermatozoides vivos. APOPTEMP=Subpoblación de espermatozoides que sufre una apoptosis temprana. APOPTARD=Subpoblación de espermatozoides que sufre una apoptosis tardía. NECROTICOS=Subpoblación de espermatozoides en estado de necrosis. VCL=Velocidad curvilínea. VSL=Velocidad rectilínea. VAP=Velocidad media. LIN=Índice de linealidad. STR=Índice de rectitud. EE=Error estándar.

Tabla 32. Prueba de homogeneidad de medias a posteriori para el factor Diluyente.

VARIABLE	DILUYENTE	MEDIA		EE
VIVOS	1C	0,32	a	0,02
	2B	0,21	b	0,02
	3BB	0,25	b	0,02
	4BOTU	0,22	b	0,02
	5BS	0,25	b	0,02
APOPTEMP	1C	0,30		0,03
	2B	0,41		0,03
	3BB	0,37		0,03
	4BOTU	0,41		0,03
	5BS	0,36		0,03
APOPTARD	1C	0,22		0,02
	2B	0,25		0,02
	3BB	0,29		0,02
	4BOTU	0,28		0,02
	5BS	0,27		0,02
NECROTICOS	1C	0,13	a	0,01

VARIABLE	DILUYENTE	MEDIA		EE
VCL	2B	0,08	b	0,01
	3BB	0,08	b	0,01
	4BOTU	0,08	b	0,01
	5BS	0,09	b	0,01
	1C	36,77		1,65
VSL	2B	33,96		1,61
	3BB	38,91		1,61
	4BOTU	35,85		1,61
	5BS	35,18		1,74
	1C	14,30	ab	0,68
VAP	2B	12,47	c	0,55
	3BB	15,56	a	0,59
	4BOTU	13,74	bc	0,57
	5BS	14,21	ab	0,62
	1C	20,34		0,98
LIN	2B	18,24		0,96
	3BB	20,55		0,96
	4BOTU	19,27		1,01
	5BS	19,91		1,04
	1C	42,79		1,24
STR	2B	37,88		1,05
	3BB	40,49		1,08
	4BOTU	38,54		1,05
	5BS	40,83		1,14
	1C	68,88		2,14
	2B	69,32		1,82
	3BB	74,86		1,91
	4BOTU	72,70		1,92
	5BS	73,73		2,02

VIVOS=Subpoblación de espermatozoides vivos. APOPTEMP=Subpoblación de espermatozoides que sufre una apoptosis temprana. APOPTARD=Subpoblación de espermatozoides que sufre una apoptosis tardía. NECROTICOS=Subpoblación de espermatozoides en estado de necrosis. VCL=Velocidad curvilínea. VSL=Velocidad rectilínea. VAP=Velocidad media. LIN=Índice de linealidad. STR=Índice de rectitud. Gl=Grados de libertad. R²=Coeficiente de determinación

Para facilitar la lectura e interpretación de las tablas 31 y 32, se representan gráficamente los resultados de la agrupación de medias a posteriori.

Como puede observarse en el gráfico 7, los sementales 2 y 4 muestran el menor grado de apoptosis tardía; la variable *VIVOS* no muestra diferencia significativa para el factor *SEMENTAL*, pero el resto de variables relacionadas con el grado de apoptosis sí. En este sentido, el semental 4 es el que presenta mayor porcentaje de espermatozoides necróticos, siendo el semental 3 el que obtiene mayor porcentaje de apoptosis tardía y el menor porcentaje de apoptosis temprana.

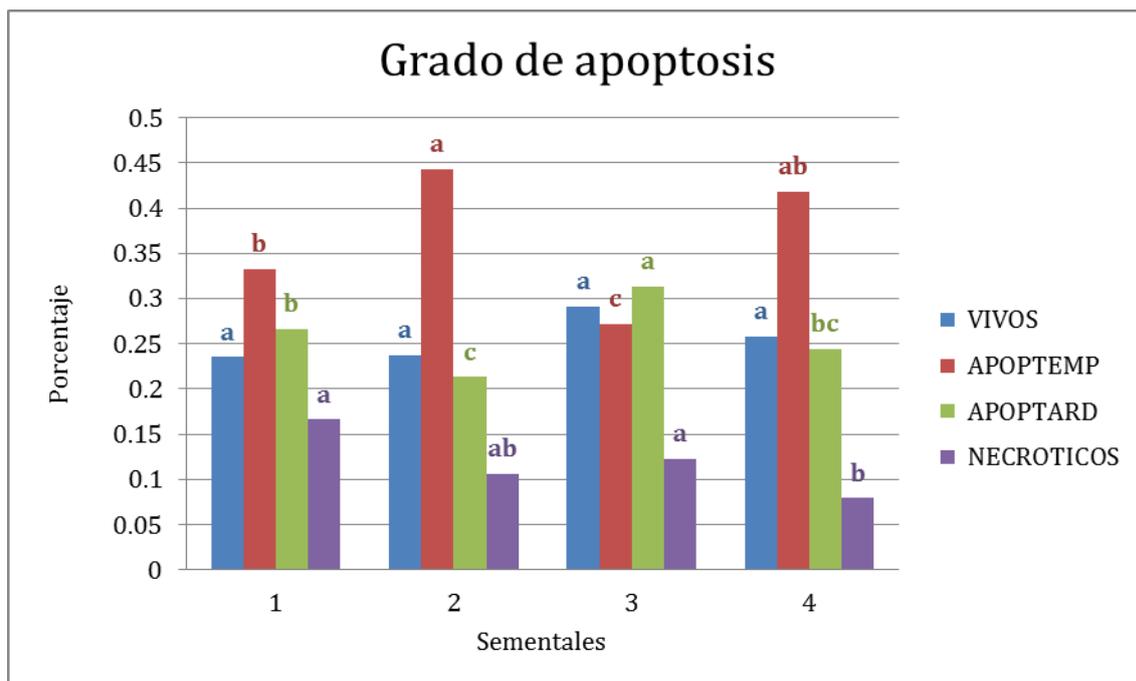


Gráfico 7. Separación de medias a posteriori del grado de apoptosis en las distintas subpoblaciones espermáticas del semen criopreservado en los cuatro caballos (Citómetro de flujo). VIVOS=Subpoblación de espermatozoides vivos. APOPTEMP=Subpoblación de espermatozoides que sufre una apoptosis temprana. APOPTARD=Subpoblación de espermatozoides que sufre una apoptosis tardía. NECROTICOS=Subpoblación de espermatozoides en estado de necrosis. Las medias, en cada columna, con la misma letra no son significativamente diferentes.

Así mismo, el diluyente 1C (Glicerol 3,5%) (Tabla 6) es el que obtiene un mayor porcentaje de espermatozoides vivos aunque también es el que presenta mayor grado de espermatozoides necróticos. El resto de diluyentes no muestra diferencias significativas entre ellos para ninguna de las cuatro variables (Gráfico 8).

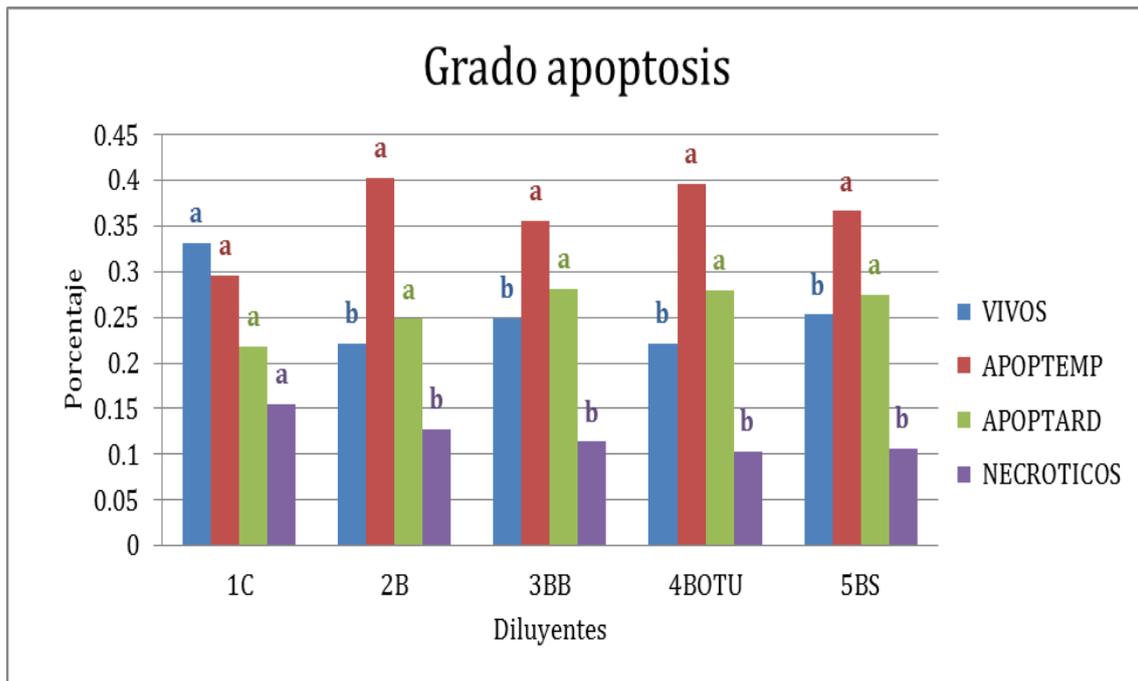


Gráfico 8. Separación de medias a posteriori de apoptosis en las distintas subpoblaciones espermáticas del semen criopreservado en los cinco diluyentes (Citómetro de flujo). VIVOS=Subpoblación de espermatozoides vivos. APOPTEMP=Subpoblación de espermatozoides que sufre una apoptosis temprana. APOPTARD=Subpoblación de espermatozoides que sufre una apoptosis tardía. NECROTICOS=Subpoblación de espermatozoides en estado de necrosis. Las medias, en cada columna, con la misma letra no son significativamente diferentes.

Atendiendo al comportamiento de las variables cinemáticas en los cuatro sementales (Gráfico 9), se aprecia que el semental 3 es el que presenta unas medias significativamente menores en las tres variables, no existiendo diferencia entre los sementales 1, 2 y 4.

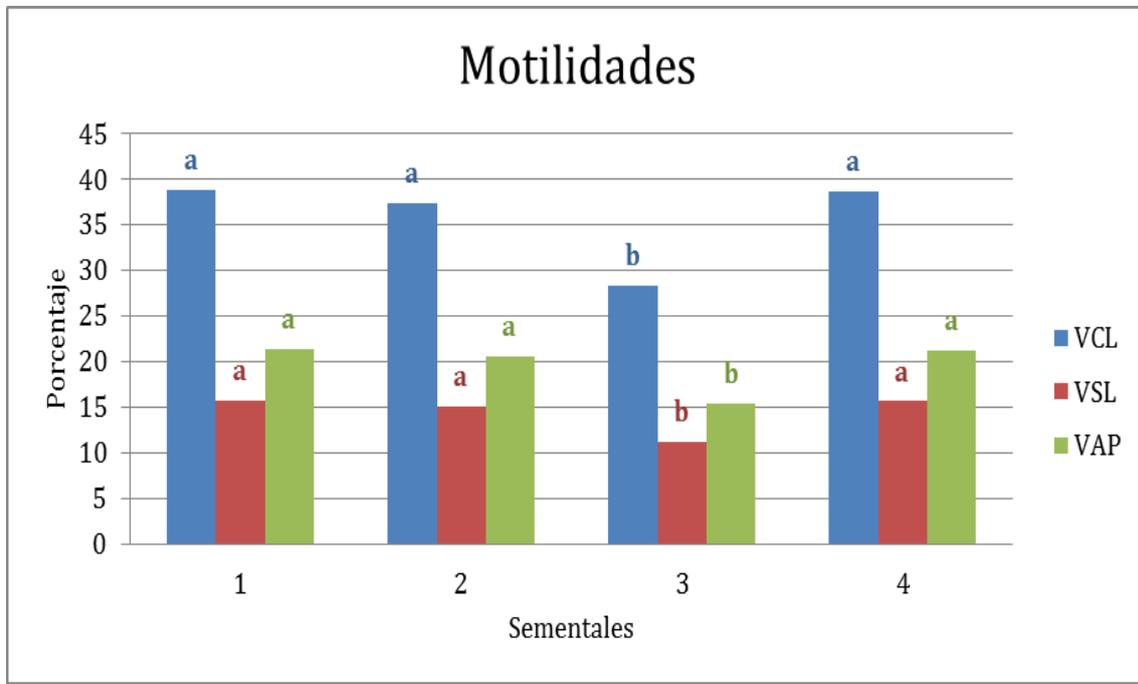


Gráfico 9. Separación de medias a posteriori de los principales descriptores cinemáticos del semen criopreservado en los cuatro caballos (sistema CASA). VCL=Velocidad curvilínea. VSL=Velocidad rectilínea. VAP=Velocidad media.

Las medias, en cada columna, con la misma letra no son significativamente diferentes. Con respecto al comportamiento de los distintos diluyentes en relación a las variables cinemáticas (Gráfico 10), cabe destacar que no es significativamente distinto para la Velocidad Curvilínea (VCL) ni para la Velocidad Media (VAP). En cambio, se aprecia como la Velocidad Rectilínea (VSL) sí se ve afectada, mostrando medias más elevadas en los diluyentes 1C (GLI 3,5%), 3BB (GLI 1% + DMF 4%) y 5BS (GLI 1% + MF 4%)

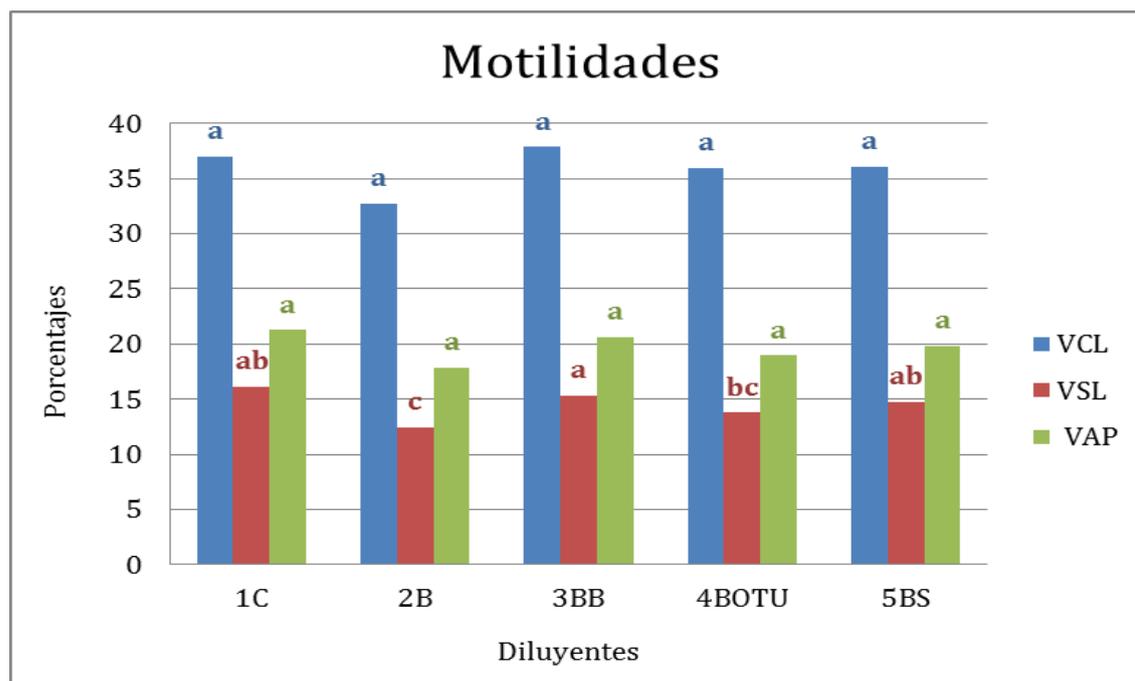


Gráfico 10. Separación de medias a posteriori de los principales descriptores cinemáticos del semen criopreservado en los cinco diluyentes (sistema CASA). VCL=Velocidad curvilínea. VSL=Velocidad rectilínea. VAP=Velocidad media. Las medias, en cada columna, con la misma letra no son significativamente diferentes.

4.2.6 Estimación del grado de susceptibilidad a la peroxidación lipídica

La exposición del espermatozoides del Caballo de las Retuertas a $80\mu\text{M}$ de sulfato ferroso (FeSO_4) durante una hora a 37°C induce un aumento significativo en el porcentaje de peroxidación lipídica (POL) ($p < 0,05$). Sin embargo, la inducción a estrés oxidativo con la misma concentración de sulfato ferroso no muestra un aumento significativo de peroxidación lipídica en el Caballo Pura Raza Español. Por otro lado, el tiempo de incubación no tiene ningún efecto significativo. (Fig. 7)

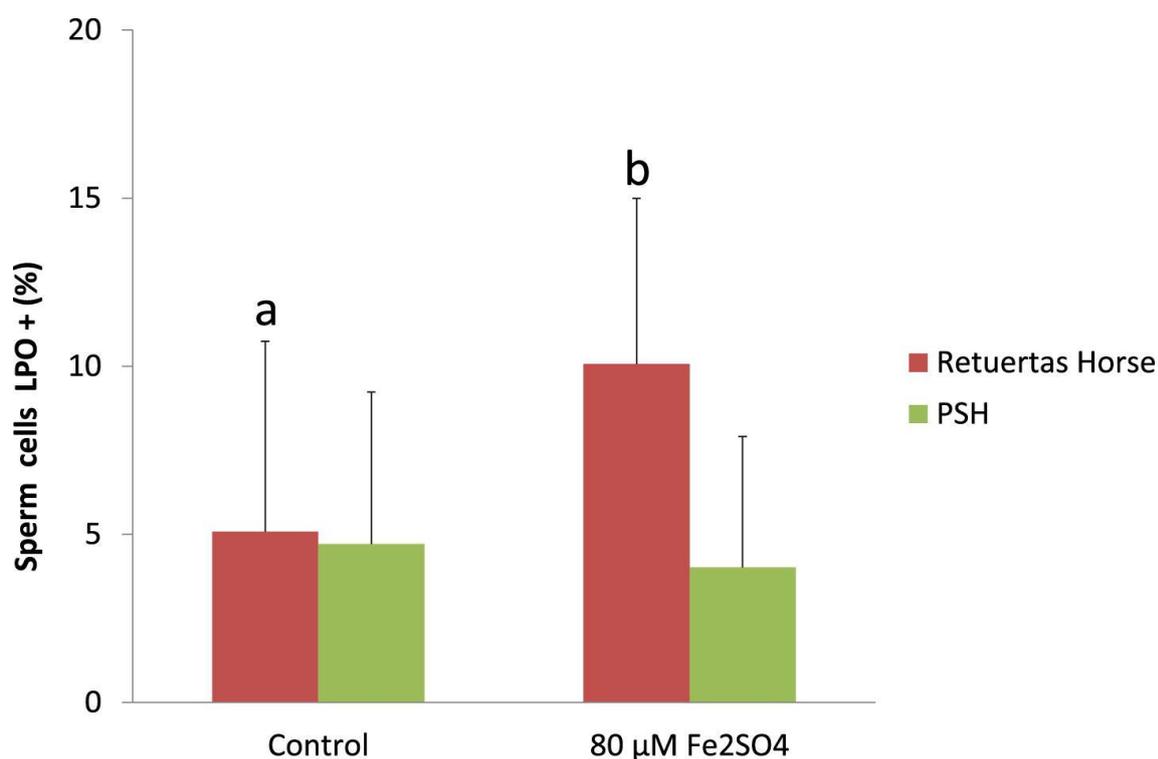


Figura 7. Variación en el porcentaje de peroxidación lipídica en espermatozoides de Caballo de las Retuertas y de Caballo Pura Raza Español, después de incubación durante una hora a 37°C con sulfato ferroso. La exposición de espermatozoides de Caballos de la Retuerta a una oxidación inducida incrementa significativamente el porcentaje de espermatozoides con peroxidación lipídica. Columnas con diferente letra (a y b) muestran valores con diferencia significativa ($p < 0,05$) 3.2. Sperm Motility and Kinematics

- *Motilidad espermática y otros parámetros cinéticos*

Las motilidades total y progresiva no se ven afectadas por el tratamiento oxidativo en ninguna de las dos razas (Figura 8. Tabla 33); Sin embargo, sí que hay diferencia significativa ($p < 0,05$) en los siguientes parámetros cinéticos: *VCL* ($70,40 \pm 24,11$ vs, $40,00 \pm 20,72$), *VAP* ($34,50 \pm 12,78$ vs, $21,38 \pm 13,18$), *STR* ($71,10 \pm 8,03$ vs, $76,25 \pm 5,90$) y *ALH* ($3,70 \pm 0,48$ vs, $2,25 \pm 1,03$). El único parámetro cinético afectado por el tratamiento oxidativo en el grupo control es el *VSL* ($27,56 \pm 3,24$ vs. $35,22 \pm 7,58$) ($p < 0,05$)

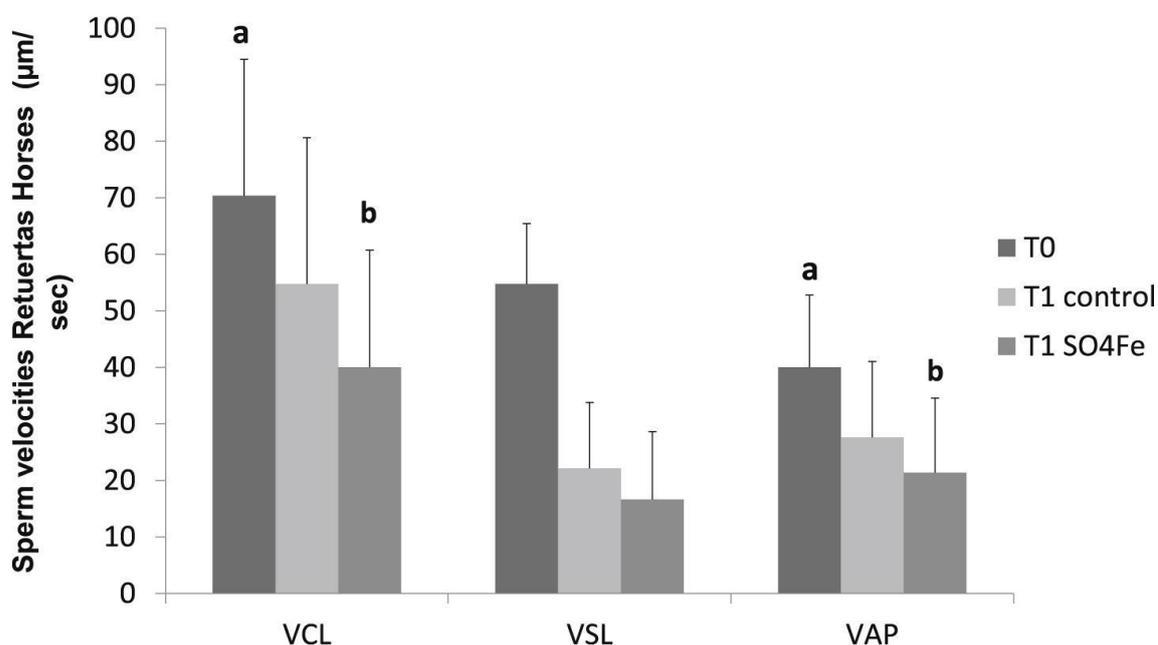


Figura 8. Velocidades espermáticas (*VCL*, *VSL* y *VAP*) en el Caballo de las Retuertas antes y después del tratamiento con $80\mu\text{M}$ de sulfato Ferroso. *T0*=Control tras 24 horas de refrigeración, *T1*=Control tras la incubación durante 1 hora a 37°C con sulfato ferroso. *T2*=Semen tras la incubación durante 1 hora a 37°C con sulfato ferroso. Columnas con diferente letra (*a* y *b*) muestran valores con diferencia significativa ($p < 0,05$)

Tabla 33. Media \pm Desviación standard (SD) para los parámetros cinéticos en el Caballo de las Retuertas (n = 16. 4 eyaculados de cada uno de los 4 sementales)

TIEMPO EXPOS.	MT	MP	LIN	STR ^a	WOB	ALH ^a	BCF
T0	60.5 \pm 26.9	38.7 \pm 27.6	34.6 \pm 6.7	71.1 \pm 8.0*	48.4 \pm 4.4	3.7 \pm 0.5*	10.8 \pm 1.7
T1	55.7 \pm 26.6	33.1 \pm 27.0	39.2 \pm 4.2	77.9 \pm 5.6	50.1 \pm 2.5	3.0 \pm 1.3	9.9 \pm 4.1
T2	42.2 \pm 20.1	15.7 \pm 18.3	40.6 \pm 7.8	76.2 \pm 5.9*	52.6 \pm 6.0	2.2 \pm 1.0*	10.0 \pm 4.4

MT=Motilidad total, MP=Motilidad progresiva, LIN= Índice de liealidad, STR=Índice de rectitud, WOB= Índice de oscilación, ALH=Amplitud media del desplazamiento lateral de la cabeza, BCF=Frecuencia de batida de la cabeza, T0=Control tras 24 horas de refrigeración, T1=Control tras 24 horas de refrigeración y la incubación durante 1 hora a 37°C con sulfato ferroso. T2=Semen tras 24 horas de refrigeración y la incubación durante 1 hora a 37°C con sulfato ferroso. a=los valores de STR y ALH fueron significativamente diferentes en las muestras control y las muestras con semen

- *Integridad de membrana*

El daño oxidativo altera la integridad de membrana espermática en el Caballo de las Retuertas pero no en el Caballo Pura Raza Española. El porcentaje de espermatozoides intactos (*Yopro-1-/eth-*) disminuye significativamente ($p < 0,05$) después del tratamiento ($57,31 \pm 7,76$ vs. $47,52 \pm 8,28$) y al mismo tiempo aumenta el porcentaje de células espermáticas necróticas ($33,27 \pm 7,83$ vs. $44,85 \pm 9,16$). La población de espermatozoides con cambios apoptóticos tempranos y tardíos *Yopro-1 (+)* y *Yopro-1 (+)/eth (+)* no se ve afectada significativamente por el tratamiento (Figura 8)

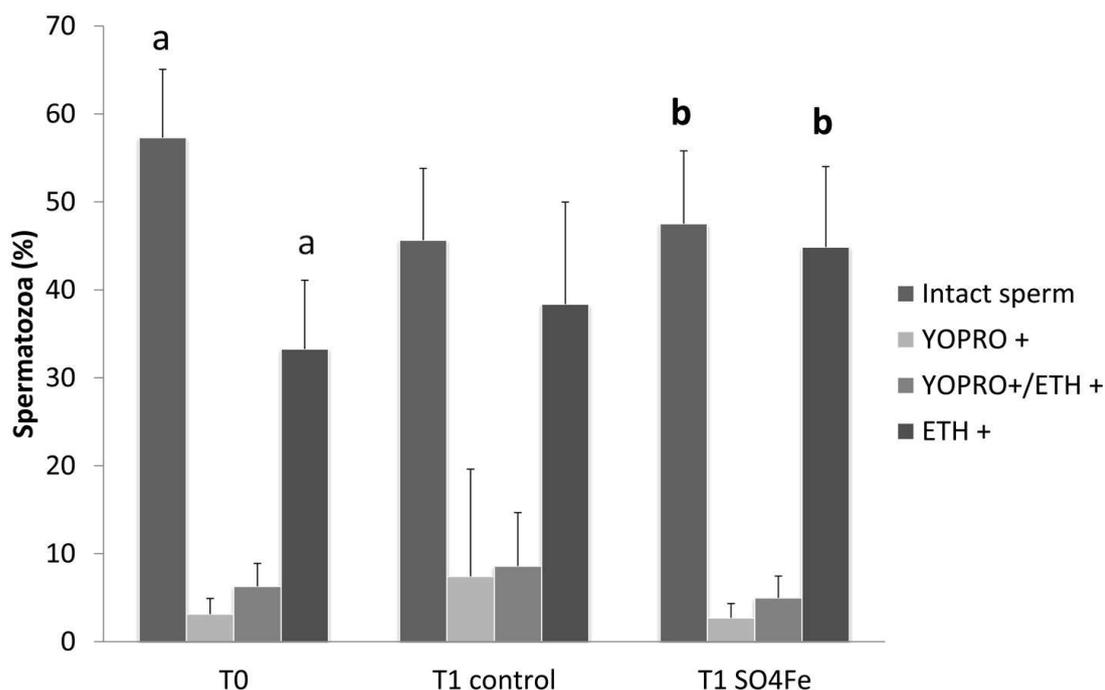


Figura 8. Efecto de la adición de $80 \mu\text{M}$ de sulfato ferroso al semen del caballo de las Retuertas tras 24 horas de refrigeración en la integridad de membrana espermática ($n = 4$ sementales, 4 eyaculados). Espermatozoides vivos (*YO-PRO-1-/Eth+*). Apoptosis temprana. Incremento en la permeabilidad de la membrana espermática (*YO-PRO-1+/Eth-*). Apoptosis tardía (*YO-PRO-1+/Eth+*) y espermatozoides necróticos (*YO-PRO-1-/Eth+*). Columnas con diferente letra (a y b) muestran valores con diferencia significativa ($p < 0,05$)

- *Potencial de membrana mitocondrial*

La incubación de espermatozoides en presencia de 80 μM de hierro (Fe^{+2}) durante una hora aumenta el porcentaje de mitocondrias que representan bajo potencial de membrana mitocondrial; esto es, el daño oxidativo reduce el porcentaje de mitocondrias activas y, al mismo tiempo, se reduce el porcentaje de mitocondrias que muestran fluorescencia naranja y verde de forma simultánea (Fig. 9) lo que significa que las mitocondrias activas se reducen como resultado de la agresión oxidativa.

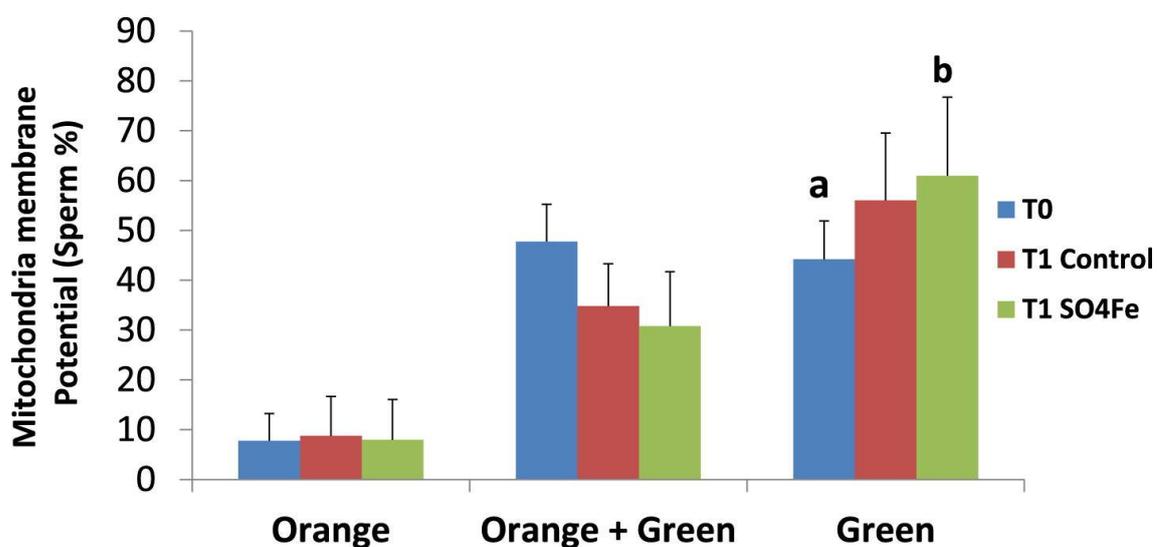


Figura 9. Efecto del daño oxidativo en la membrana mitocondrial del espermatozoides de sementales de la Retuertas (Porcentajes de alto, bajo e intermedio potencial de membrana mitocondrial). Columnas con diferente letra (a y b) muestran valores con diferencia significativa ($p < 0,05$)

4.2.7 Criopreservación seminal

Se dispone de un banco de germoplasma que consta de un total 250 dosis seminales, es decir, 2000 pajuelas de 0,5 cc (8 pajuelas por dosis). La concentración seminal es de 50 millones de espermatozoides por pajuela y 400 millones de espermatozoides por dosis. Como medida de seguridad, el banco se gestiona en dos ubicaciones diferentes: En el laboratorio de Investigación Aplicada de Cría Caballar, se gestionan 125 dosis seminales y en el laboratorio de Reproducción Asistida del departamento de Genética de la Universidad de Córdoba, se gestionan las 125 dosis restantes.

5. DISCUSIÓN DISCUSIÓN DEL ANÁLISIS DEMOGRÁFICO

La población del caballo de las Retuertas cuenta con tan sólo 199 animales (181 en la población actual o animales vivos) con genealogías contrastadas; existiendo en el censo histórico datos de un total de 253 animales con sangre Retuertas en distintos porcentajes; cifras comparables a otras razas equinas en peligro de extinción como la Jaca Navarra, Caballos Mallorquín y Menorquín en las primeras fases de sus programas de conservación (Checa *et al.*, 2005). La pirámide de edades revela una expansión progresiva del censo en los tres últimos años, llegando casi a duplicar el número de animales registrados en el año anterior. Otro dato a destacar es la gran longevidad que alcanzan algunos animales, especialmente las hembras, a pesar de las duras condiciones de su hábitat. Se comparan varios parámetros demográficos con otras dos razas: el caballo Hispano-Árabe, cuyo núcleo selectivo tiene un censo de 1041 (Gómez *et al.*, 2011), y el caballo marismeño, con un censo de 252 animales (Cruz *et al.*, 2010). Con respecto a la tasa de reposición en machos (10,26%) y hembras (5,56%), cabe destacar el bajo porcentaje, sobre todo en hembras, al compararlo con el caballo Hispano-Arabe: 11,68% y 12,66%, respectivamente. La explicación de la baja reposición en hembras es que prácticamente no existe una reposición artificial; es decir, sólo se descartan las hembras que fallecen por causas naturales. No existe un desvieje o descarte por mano del hombre. El intervalo generacional o edad media un progenitor cuando nacen sus descendientes que luego serán reproductores (Van der Werf, 2000), es también un factor importantes en las medidas de gestión de las poblaciones; en el caballo de las Retuertas, es de 8,98 en hembras y 8,04 en machos, siendo similares al caballo Hispano-Árabe, donde los intervalos se sitúan en 8,95 y 8,31, respectivamente; estando en el caballo Marismeño en un rango intermedio con 8,7 en hembras y 5,96 en machos. En el caballo Árabe en Francia, Moreaux *et al.*, (1996) encontraron un L de 10,6 años, siendo de 11,01 en el PRE y 8,53 en el Hucul.

El parámetro de tamaño efectivo de la población es uno de los más sensibles, dependiendo de la calidad de la información del pedigrí (Goyache *et al.*, 2003), Gutierrez *et al.*, (2009) recomiendan un mínimo de 2 generaciones completas antes de considerar a los individuos consanguíneos. Existen tres factores que se pueden obtener del cálculo del tamaño efectivo de la población y pueden causar resultados inesperados: El primero es haber empleado un reducido número de generaciones de ancestros para calcular la intensidad de consanguinidad, El segundo es considerar como fundador a un individuo con madre o padre no encontrado en el pedigrí; es decir, con un resultado erróneo en la filiación. En tercer lugar, la coexistencia de individuos foráneos. El tamaño efectivo calculado a través del incremento de la consanguinidad depende del coeficiente de consanguinidad individual. Para el caballo de las Retuertas El tamaño efectivo (N_e) da como resultado 181,16, una cifra muy similar al censo real, hecho que contrasta con el Marismeño y con el Hucul, de origen eslovaco y en peligro de extinción (Pjontek, 2012), cuyos N_e son de 91 y 47,67 respectivamente; cuyos valores son mucho menores que sus censos reales: 252 y 158, respectivamente. Esta diferencia se debe a que la población el caballo Marismeño ni la del Hucul están gestionadas por la Administración, sino por los propios ganaderos, los cuales emplean una rotación de sementales como herramienta reproductiva, requiriendo, en consecuencia, menor proporción de machos que de hembras. Esta proporción entre machos y hembras se define por el ratio sexual que es de 1/1,38, debido a las condiciones de asilvestramiento; en cambio, en el caso del caballo Marismeño, al estar mucho más influenciado por la mano del hombre, el ratio sexual es de 1/9,8. El incremento de consanguinidad por generación ($\Delta F_{\text{por generación}}$) es del 0,26% siendo el más bajo de las tres razas comparadas; en cambio, el $\Delta F_{\text{por año}}$ es de 0,03%, situándose en una posición intermedia entre las otras dos razas.

El número efectivo de fundadores (f_e) indica la pérdida de diversidad genética causada por una contribución desequilibrada de los fundadores. Si los fundadores han participado equitativamente en la transmisión de genes a la descendencia, el número efectivo de fundadores será igual al número actual de fundadores. La variabilidad genética del caballo de las Retuertas, es pues desequilibrada, ya, a pesar de existir 13 fundadores, el f_e es de tan sólo 5. Algo parecido y de forma más acusada aún ocurre en el caballo Hucul y en el Pura Raza Española (PRE), cuyas poblaciones cuentan con 134 y 1465 fundadores y resultando f_e de 26 y 39,6, respectivamente (Tabla 11)

Otro parámetro relacionado con la probabilidad del origen de los genes es el n^o efectivo de ancestros (f_a); el cual, si es muy elevado, puede derivar en la pérdida de diversidad genética en una población causada por un cuello de botella en el pedigrí y, de acuerdo con Boichard *et al.*, (1997), se define como el mínimo número de ancestros que permite explicar el 100% de la diversidad genética de la población. Estos ancestros no tienen por qué ser fundadores, el f_a en el caballo de las Retuertas es de 5, mientras que en el caballo Hucul es de 46 y en el PRE de 331.

Como resultado del cuello de botella, en ambos casos, el n^o efectivo de ancestros es menor que el n^o de ancestros de la población. Los 10 ancestros más representativos para el Caballo de las retuertas nacieron entre 1987 y 1999 y los del Hucul, entre 1895 y 1979. Lo que confirma que el estudio de la genealogía en el Caballo de las Retuertas es muy reciente, en comparación con el Hucul, el cual cuenta con datos genealógicos desde hace más de 100 años. Por otro lado, estos 10 ancestros explican el 100% de la variabilidad genética, en el Caballo de las retuertas y el 66,71% en el Hucul.

La contribución marginal de los individuos es desequilibrada, y los 3 primeros individuos explican más del 35% de esta variabilidad. La descendencia de una población con una representación desequilibrada de sus principales fundadores, mostrará, debido a la disminución de heterocigosis, menos variación genética que una población con el mismo número de fundadores con una contribución equilibrada a las futuras generaciones.

El valor medio de consanguinidad caracteriza una población y su aumento implica cambios en la estructura genética a favor de homocigotos, lo que desencadena una pérdida de diversidad genética. En el Caballo de las Retuertas, el Coeficiente de Consanguinidad individual (F) resultó ser f_e 9,78% en la población actual, siendo en el Hucul y en el PRE de 6,26% y 9,08%, respectivamente. Altos niveles de Coeficiente de consanguinidad, coeficiente de parentesco medio e incremento de la consanguinidad individual, así como un reducido tamaño efectivo de la población derivan en una pérdida de variabilidad genética y una posible expresión fenotípica de ciertos defectos genéticos. Es muy importante recalcar que, si por el contrario, en la población estudiada se detecta un coeficiente de consanguinidad bajo (como puede apreciarse en el Hucul, en comparación con el PRE y el Retuertas) ha de tenerse en cuenta que este dato puede deberse a una falta de información del pedigrí, y no debiendo interpretarse como una población con buena salud genética. Parland *et al.*, (2007) explicaron que un bajo valor de consanguinidad puede deberse a la importación de material genético. De la misma manera, la migración de ciertos individuos de la población puede afectar también a un descenso de la consanguinidad, Moreaux *et al.*, (1996) y Cervantes *et al.*, (2008) encontraron una correlación altamente significativa entre una alta consanguinidad y el número equivalente de generaciones. El mejor criterio para evaluar la calidad de la información del pedigrí es el n^o equivalente de generaciones completas (Maignel *et al.*, 1996). En el caballo de las retuertas, se encontraron 3 generaciones equivalentes completas, en los animales nacidos entre 1970 y 2013 y Cervantes *et al.*, (2008) encontraron en la población nacida entre 1995 y 2004 del Caballo Hispano-Árabe, 79 generaciones equivalentes; mientras que Álvarez *et al.*,

(2010), calcularon que existía 25 generaciones equivalentes en la población de caballo Mallorquín nacida entre 2005 y 2007. Cifras que vuelven a poner de manifiesto que, el estudio demográfico del Caballo de las Retuertas está en sus fases iniciales.

5.2 DISCUSIÓN DE LA CARACTERIZACIÓN SEMINAL

En el presente estudio, se induce la POL con sulfato ferroso (FeSO_4) a una concentración de $80\mu\text{M}$ (Aitken, Wingate *et al.*, 2007) para provocar la reacción de Fenton. La proporción de células espermáticas que muestran POL en muestras refrigeradas de control se encuentra en un rango de 0.58 a 10.74%. Investigaciones anteriores (Ball y Vo 2002; Christova, James *et al.*, 2004) indican que la adición de sulfato ferroso aumenta la peroxidación lipídica en semen refrigerado según la dosis, disminuyendo también la motilidad espermática. Los resultados del presente estudio revelan un aumento estadísticamente significativo (aunque no extremadamente alto) de peroxidación de la membrana espermática de estos sementales ($5,15 \pm 14,99\%$) tras ser expuestos al tratamiento oxidativo.

Por otra parte, las motilidades masal y progresiva no se ven afectadas. Este hecho puede explicarse por dos razones: la primera es que la membrana espermática del Caballo de las Retuertas sea más resistente a ese daño oxidativo debido a una composición diferente de dicha membrana lipídica. Recientes estudios indican que la susceptibilidad a la POL está relacionada con la composición de la membrana plasmática espermática (García, Fernández *et al.*, 2011). En segundo lugar, es probable que la concentración descrita por Aitken, Wingate *et al.* (2007) para oxidar la membrana espermática en humanos no sea suficiente para peroxidar las células espermáticas equinas, siendo necesario una concentración mayor para esta especie. La peroxidación lipídica es perjudicial para los espermatozoides, teniendo un efecto nocivo en las funciones de motilidad y fertilización (Aitken and Curry 2011).

Un reciente estudio en humanos (Aitken, Gibb *et al.*, 2012) demostró que la incubación prolongada de espermatozoides *in vitro* repercutía en una pérdida de motilidad asociada a un aumento de ROS mitocondrial. Este aumento en la producción de radicales libres se asoció a la formación de aldehídos citotóxicos originados por la peroxidación lipídica. Sin embargo, los resultados obtenidos en el presente estudio muestran que las motilidades masal y progresiva no se ven afectadas por el tratamiento con Fe_2SO_4 . Teniendo en cuenta que Ball y Vo demostraron que únicamente con una alta concentración de sulfato ferroso (0.5 mM) se reducía significativamente la motilidad espermática (Ball and Vo 2002), es probable que la concentración usada en este trabajo sea insuficiente para afectar a la motilidad. Sin embargo, el tratamiento sí afecta a la velocidad: las VCL, VSL y ALH se reducen significativamente ($p < 0.05$) (VCL: $70,4 \pm 24,11$ vs, $40 \pm 20,72$; VSL: $34,5 \pm 12,78$ vs, $21,38 \pm 13,18$; ALH: $3,7 \pm 0,48$ vs, $2,25 \pm 1,03$). Por el contrario, la STR aumenta tras el tratamiento. De acuerdo con estos resultados, un estudio reciente de Aiken, Whiting *et al.*, (2012) revela que el nivel de formación de aldehído obtenido tras la adición del promotor del ión ferroso está inversamente correlacionada con la motilidad espermática, su viabilidad *in vitro* y su competencia por la fusión con el oocito. De hecho, el parámetro de velocidad más afectado por el tratamiento es la VCL, que es el parámetro más correlacionado con la fertilidad (Olds-Clarke. 1996).

El daño oxidativo también afecta al potencial de membrana mitocondrial. Las mitocondrias son la principal fuente de ROS en el espermatozoide. Descubrimientos previos revelan que estas organelas son las estructuras subcelulares más sensibles a la refrigeración y congelación (Ortega-Ferrusola, Sotillo-Galan *et al.*, 2008; García, Moran *et al.*, 2011; Pena, Ferrusola *et al.*, 2012)

De acuerdo con esto, la adición de Fe_2SO_4 disminuye significativamente la subpoblación de esperma con potencial de membrana alto y bajo simultáneamente, y aumenta la subpoblación con bajo potencial. El poro de permeabilidad transitoria mitocondrial tiene un papel importante en la inducción de la apoptosis; la apertura de este canal conduce a un aumento del potencial de membrana mitocondrial y permite la liberación de factores proapoptóticos (Ferrusola, Fernandez *et al.* 2010). El aumento de este potencial es un marcador apoptótico, el cual se eleva después de la criopreservación y está involucrado en la muerte celular y en el daño subletal. Finalmente, como era de esperar, el tratamiento con Fe_2SO_4 también causa un daño importante a la integridad de la membrana espermática. Estudios previos (Ortega-Ferrusola, Sotillo-Galan *et al.*, 2008; Ortega-Ferrusola, Garcia *et al.*, 2009) mostraron una relación directa entre la POL y la integridad de membrana. La población de esperma intacto (Yopro-1 (-)/eth (-)) disminuye tras la inducción con el promotor del ión ferroso, aumentando, por el contrario, la población de esperma necrótico (eth(+)).

En resumen, este caballo en peligro de extinción, a pesar de su alto índice de consanguinidad, no presenta una mayor susceptibilidad a la peroxidación lipídica, siendo comparable a otras razas equinas el daño inducido por una exposición a un agente oxidativo en esta raza.

Con respecto a las variables cinéticas, el valor medio de motilidad masal (MM) es de 3,84; encontrándose todos los sementales por encima de 4 salvo el semental 3, cuya MM es de 2,8. En la bibliografía consultada, no se describe la motilidad masal, sino la motilidad total. Ambos términos hacen referencia al número de espermatozoides móviles, siendo la escala en la motilidad masal de 1 a 5 y en la motilidad total de 1 a 100, representándose esta última como un porcentaje. Lozano *et al.* (2011) describen que las movilidades totales de semen equino fresco deben encontrarse entre el 60% (MM=3) y el 80% (MM=4), mientras Candeias *et al.* (2012) hallan un promedio de movilidad total de 83,5% (MM=4), siendo este último un resultado bastante cercano al hallado por Restrepo *et al.* (2013) en el caballo criollo colombiano: 83,3% (MM =4). Bradford *et al.* (2012) describen una Motilidad masal de 4,5 (Motilidad total = 89%). En cuanto a equinos de razas locales, como el asno chileno Baudet Du Poitou (Ebel Barrera, F.A. 2012) el criollo colombiano (Restrepo *et al.*, 2013) o el Mangalarga Marchador (Candeias *et al.*, 2012), las MM son 4,39, 4,16 y 4,17, respectivamente. En cambio, Mosqueira Podestá, T.J. 2012, encuentra una MM de 3,25 (MT= 65) en sementales de razas de tiro pesado ARdenés, Bretón de Montala y Percherón. En cualquier caso, y siguiendo las recomendaciones de Lozano *et al.* (2011), tres de los 4 sementales cuentan con una calidad seminal comparable a otras razas equinas. La motilidad progresiva (MP) es superior al 60% en tres sementales, pero en el semental 3 no alcanza el 50%, descendiendo la media de los cuatro sementales por debajo del 60%. Macías García *et al.* (2011) recomiendan trabajar con una MP igual o superior al 60%. Estos mínimos los cumplen el asno chileno y el caballo colombiano, con unas MP de 63,6% y 78,7%. Perez *et al.* (2008) y Coccha *et al.* (2011) también describen unas MP de 68,3 y 73%; para el caballo Mangalarga Marchador y el Standardbred, respectivamente. Por el contrario, existen varias publicaciones que describen Mp por debajo del 60%; este es el caso de Bradford *et al.* (2014) y Mosqueira *et al.*, (2012), quienes hayan una MP de 32% y de 18% en caballos de razas ligeras y razas pesadas, respectivamente. De la misma manera, se describe una MP de 42% y de 41,5% en Sementales del Caspio (Cabrera *et al.*, 2014) y sementales de Shetland, respectivamente. Estos últimos resultados son comparables a la MP=48% del caballo 3 del presente estudio. El volumen medio de semen en cada eyaculado es de 23,25ml en los cuatro sementales, encontrándose un CV muy elevado en esta variable. Así en el semental 3, el V= 18,93ml es comparable al V=18ml de sementales del Caspio (Cabrera *et al.* 2014). En el otro extremo se sitúa el semental 2 con un V=32,73ml. En la bibliografía consultada, se encuentran valores medios de V=48,6ml en el asno

chileno Baudet duPoitou (Ebel Barrera, 2012). En cuanto a la concentración espermática, la media de los cuatro sementales es de 309,34 millones de espermatozoides/ml, pero el coeficiente de variación también es muy elevado para esta variable (CV= 48,34) Así, en el semental 3 se obtiene una media de 222,62 millones de espermatozoides/ml y en el semental 4, 373,48 millones de espermatozoides/ml. Bradford *et al.* (2012) encuentran una concentración de 320 en algunas razas equinas ligeras, llegando hasta 376 millones de espermatozoides en el asno Baudet duPoitou (Ebel Barrera, 2012). En todas las publicaciones consultadas, los CV son muy elevados, coincidiendo con Hoffmann *et al.* (2011) en la gran variabilidad entre animales con respecto a las distintas variables empleadas para valorar la calidad seminal.

Atendiendo a los crioprotectores a pesar de que el glicerol es el agente crioprotector más empleado para la congelación de semen en la especie equina, la Dimetilformamida (DMF) da mejores resultados como crioprotector en estudios recientes (Squires *et al.*, 2004; Medeiros *et al.*, 2002; Gomes *et al.*, 2002; Vidament *et al.*, 2002; Alvarenga *et al.*, 2005). La efectividad de un crioprotector se ve favorecida en gran medida por un bajo peso molecular; además, debe ser soluble en agua y causar baja toxicidad (Pegg *et al.*, 2007.). El menor peso molecular de la DMF con respecto al glicerol (73 vs 92) le permite penetrar en la membrana más rápidamente produciendo así un cambio en el volumen celular menor que el que puede producir el glicerol, lo cual se puede reflejar en un mayor porcentaje de movilidad y de espermatozoides vivos o con la membrana íntegra. Además, el glicerol es tóxico por efectos directos en el metabolismo celular, alterando la bicapa lipídica y modificando la tasa de permeabilidad de agua e iones. Igualmente, el glicerol interacciona con proteínas y lipoproteínas de membrana y aumenta la demanda energética celular (Hammerstedt *et al.*, 1990). En la revisión realizada no se reporta toxicidad de la dimetilformamida como agente crioprotector de espermatozoides. Por todas estas razones, cabe esperar que den mejores resultados los diluyentes compuestos por Dimetilformamida; sin embargo, en este estudio se obtiene un menor porcentaje de espermatozoides apoptóticos empleando únicamente el glicerol como crioprotector (al 3,5%) que en combinación con otro crioprotector ya sea dimetilformamida (DMF) o metilformamida (MF), ambas al 2,5 ó 4 %. Con respecto a las velocidades, no existe diferencia significativa entre el empleo de glicerol al 3,5% en comparación con la DMF 4% o MF 4%. Estos resultados coinciden con los expuestos por Vidament *et al.* (2002), quienes realizan varias combinaciones de distintos porcentajes de glicerol y dimetilamida y concluyen que ninguna de estas combinaciones es más eficiente que el uso de un único crioprotector, ya sea glicerol o dimetilformamida.

En el presente trabajo, la Velocidad Rectilínea (VSL) es la única variable que se ve afectada significativamente por el diluyente empleado; así, es menor cuando se emplea DMF y MF, ambas al 2,5%. Estos resultados coinciden con los de Vidament *et al.* (2002), quienes obtienen peores motilidades con concentraciones bajas de DMF. Las mejores motilidades se dan con el diluyente 1 (3% Glicerol), el diluyente 3 (1% Glicerol+4%DMF) y diluyente 5 (1%Glicerol+4%MF). Restrepo *et al.* (2012) también encuentran buenas motilidades en sementales de raza criollo Colombiano empleando DMF al 5%. Candeias *et al.* (2012) en el Mangalarga Marchador y Ebel Barrera (2012) en el asno chileno Baudet duPoitou comparan varios diluyentes y hallan mejores motilidades al combinar MF al 4% con glicerol al 1%, siendo esta composición de crioprotectores la misma que la del diluyente 5 del presente estudio.

Gomes *et al.* (2002) y Gibba *et al.*, (2010) también comparan la acción de amidas y glicerol como agentes crioprotectores en la congelación de semen en caballos, encontrando que los espermatozoides congelados con DMF tienen una movilidad total superior a los congelados con glicerol y al de otros tratamientos. Sin embargo, Gibb *et al.*, sólo encuentran diferencia en movilidad y no en

integridad de membrana. Los experimentos que evalúan el efecto del glicerol contra DMF y aplicados conjuntamente tienen resultados controversiales. Vidament *et al.* (2002) encuentran que la movilidad no mejora al utilizar la combinación de estos crioprotectores y que el uso de la DMF presenta resultados comparables con los del glicerol, mientras que Medeiros *et al.* (2002) Reportan que la asociación de glicerol con DMF presenta resultados de movilidad mejores que los del glicerol solo, pero esta asociación no tiene diferencia con el tratamiento que utiliza únicamente DMF.

Ampliando la comparación de ambos crioprotectores en otras especies, Buranaamnuay *et al.* (2011) sugieren que reemplazar el glycerol por DMF no mejora la calidad del semen de verraco tras el proceso de congelado y descongelado del semen. Así mismo, Lopes *et al.* (2009) concluyen que el uso de DMF para reemplazar el glycerol no aporta ningún beneficio a la criopreservación de semen canino.

La existencia de diferencias marcadas en los resultados entre los estudios de la movilidad espermática, puede ser debida al uso de diferentes protocolos de criopreservación y concentración de crioprotectores, al origen y la raza de los animales incluidos en los estudios e incluso a la calidad del semen sometido a la criopreservación. Esta última, ligada a alta variabilidad existente entre los reproductores y entre los eyaculados de un mismo reproductor (Hoffmann *et al.*, 2011). En el presente trabajo, todos los diluyentes cuentan con un porcentaje de glicerol, pudiendo ser ésta la causa de que los diluyentes a base de DMF no proporcionen unos mejores resultados que el que emplea únicamente glicerol, como reportan Gibb *et al.*, quienes obtienen una mejor motilidad espermática empleando Dimetilformamida al 4% que empleando una combinación de glicerol al 2% y de DMF al 2%.

El uso de DMF como agente crioprotector no resulta una alternativa factible para mejorar la movilidad espermática, la integridad de membrana y la vitalidad. De cualquier modo, es necesario continuar con estudios que empleen únicamente la dimetilformamida como crioprotector, sin que lleven ninguna proporción de glicerol, así como encontrar qué combinación emplear para optimizar los resultados, ya que se ha reportado que el glicerol tiene un efecto contraceptivo en yeguas (Gomes GM, Jacob JCF, Medeiros AS, Papa FO, Alvarenga MA. Improvement of stallion spermatozoa preservation with alternative cryoprotectants for the Mangalarga Marchador breed. *Theriogenology* 2002; 58:2.). Además, deben realizarse pruebas posteriores de fertilidad para verificar si el efecto benéfico de la DMF sobre las características espermáticas post-descongelación se manifiesta en una mayor tasa de concepción.

6. *CONCLUSIONES* Se reconstruye el árbol genealógico de la raza a partir de los datos demográficos disponibles y de los controles de filiación que se realizan todos los años en esta población utilizando marcadores moleculares. Se determina que la población fundadora fue muy reducida, disponiendo en el momento del estudio de 199 individuos distribuidos en 4 generaciones efectivas.

El número de ejemplares del Caballo de las Retuertas es reducido y el acceso a la reproducción está limitado a unos pocos sementales cada año, esto provoca que el incremento de la consanguinidad vaya creciendo paulatinamente reduciéndose el tamaño efectivo de la misma. Se necesita, a la vista de los resultados, ejecutar estrategias de retrocruzamiento para conservar el estatus genético de esta singular y valiosa población equina.

Las características reproductivas del caballo de Las Retuertas son comparables a otras razas autóctonas y poblaciones locales. Existe un elevado coeficiente de variación entre sementales en la mayoría de las variables estudiadas, coincidiendo con los resultados obtenidos en todos los estudios relacionados con la calidad seminal en la especie equina que se han consultado para llevar a cabo este trabajo.

Se ha creado un banco de germoplasma con cuatro sementales. Tres de ellos cumplen los requisitos mínimos de calidad seminal exigibles. En cambio, algunas de las dosis seminales perteneciente al semental 3 no son aptas para ser empleadas en futuras inseminaciones; si bien, no han sido eliminadas a la espera de futuras técnicas que puedan recuperar de esas muestras y de forma óptima un porcentaje de espermatozoides con capacidad fecundante suficiente como para obtener descendencia.

CONCLUSIONS

The pedigree of the breed is reconstructed from the available demographic data and affiliation controls carried out every year in this population by using molecular markers. It is determined that the founding population was very small, having 199 individuals, at the time of the study, distributed in 4 effective generations.

The number of Retuertas horse specimens is reduced and the access to reproduction is limited to a few stallions each year, this causes the population's increase of inbreeding gradually grows reducing its effective size. It is necessary, in light of the results, to implement backcross strategies aiming at conserving the genetic status of this unique and valuable equine population.

The Retuertas horse's reproductive characteristics are comparable to other native breeds and local populations' ones. There is a high coefficient of variation between stallions for the most of the studied variables, coinciding with the results of all studies related to semen quality in the equine species which have been consulted to carry out this study.

7. ANEXO I

Con los resultados de este trabajo se dispone de información suficiente sobre la población para plantear un programa de conservación completo que contemple aspectos de conservación *in vivo*, *in situ* y *ex situ*

7.1. PLANTEAMIENTO DE UN PLAN DE CONSERVACIÓN *IN VIVO IN SITU*

Consiste en mantener un número determinado de sementales de Las Retuertas entre una población de hembras de otras razas cercanas genéticamente para aumentar la población. A partir de la cuarta generación, los individuos dejan de considerarse animales cruzados y pueden reubicarse con los demás caballos Retuertas. Este programa ya se ha iniciado en la Estación Biológica de Doñana. En la finca de Guadamar, existe una población de distintas generaciones de individuos cruzados.

- Primera generación: 1/2 Retuertas
- Segunda generación: 3/4 Retuertas
- Tercera generación: 7/8 Retuertas
- Cuarta generación: 15/16 Retuertas

A partir de esta cuarta generación, los animales son considerados Retuertas y se reintroducen en la finca El Coto, lugar donde se encuentra toda la población de sangre 100% Retuertas, aislada físicamente de otras poblaciones equinas.

7.2. PLANTEAMIENTO DE UN PLAN DE CONSERVACIÓN *IN VIVO EX SITU*

En este caso, se plantea la segmentación de la población para garantizar la diversidad genética en otro espacio protegido del territorio nacional español. Actualmente, existe un programa piloto en la reserva Campanarios de Azaba, Salamanca. El 28 de julio de 2012, se liberaron 24 caballos de las Retuertas, dentro del programa de conservación *Rewilding Europe Oeste Ibérico* (www.rewildingeurope.com), y con la colaboración existente entre la Estación Biológica de Doñana y la Fundación Naturaleza y Hombre (FNYH)



Imagen 4. Población de ejemplares de caballos de Las Retuertas en la reserva Campanarios de Azaba, Salamanca. Plan de conservación in vivo ex situ

La creación de este nuevo núcleo de retuertas en Campanarios, donde ya se está produciendo el nacimiento de nuevos potros, da muestra de la excelente adaptación que estos caballos salvajes han tenido en la dehesa salamantina y será garantía de supervivencia de la raza en Doñana ante cualquier problema sanitario o catástrofe natural.

8. *PUBLICACIONES RELACIONADAS CON ESTE ESTUDIO*

Pérez Rico A., Crespo Castejón F., Sanmartín Sánchez L., Miró Arias M^a., Vega Pla J.L. Selección de genes de referencia en semen equino criopreservado para su uso en estudios de expresión genética con la técnica de PCR cuantitativa. *Sanid. mil.* 2014; 70 (1): 20-29; ISSN: 1887-8571

Miró-Arias M., León J.M., Vallecillo A., Barba C., Nogales S., Vega-Pla J. L. Análisis demográfico del caballo de Las Retuertas como base para el desarrollo de su programa de conservación. *AICA 2* (2012) 147147-150

Vega-Pla, J.L., J. Calderón, P.P. Rodríguez-Gallardo, A.M. Martínez and C. Rico (2006). Saving feral horse populations: does it really matter? A case study of wild horses from Doñana National Park in southern Spain. *Animal Genetics* 37, 571-8

Vega-Pla, J.L., J. Calderón, P.P. Rodríguez-Gallardo, B. Alcaide, FTPS Sereno, M.R. Costa, E. Pérez-Pineda, A.M. Martínez, J.V. Delgado and C. Rico (2005) The Retuertas horse: the “missing link” in the Iberoamerican horse breeds origin? In: *Conservation genetics of endangered horse breeds* (EAAP Publication) 116, 167-76. Wageningen Academic Press. Wageningen

Maria Miró-Arias, Juan Maria Gallardo Bolaños, Antolin Morillo-Rodríguez, Carolina Balao da Silva, Ines Maria Aparicio, Jose Antonio Tapia, Angel Vallecillo, Jose Luis Vega-Pla, Fernando Juan Peña Vega, Cristina Ortega Ferrusola. Sperm Susceptibility to Oxidative Stress in the Retuertas Endangered Horse. *Journal of Equine Veterinary Science.* (2013) Volume 33, Issue 11, Pages 962–968

E. Varela, M. Miró, C Ortega Ferrusola, C Silva, A.Miró, B. Macías García, C. Silva, A. Vallecillo, C. Berrocal, J.M. Gallardo Bolaños, A. Morillo, J.A. Tapia, J.L. Vega-Plá, F.J. Peña. Susceptibility to oxidative stress of the spermatozoa of an endangered breed of horses. *Reprod. Dom. Anim.* 45 (Suppl. 2), 79,102 (2010)

9. PRESENTACIONES EN CONGRESOS

TÍTULO	CONGRESO	FECHA
ELCABALLO DE LAS RETUERTAS: ANÁLISIS DEL PEDIGRÍ Y CONSANGUINIDAD	JORNADAS DE INVESTIGACIÓN SOBRE LA CONSERVACIÓN DE DOÑANA. CSIC SEVILLA	2014
COMPARACIÓN DE LA CALIDAD SEMINAL EN FRESCO Y POSTDESCONGELADO DEL CABALLO DE LAS RETUERTAS	II CONGRESO CIENTÍFICO DE JÓVENES INVESTIGADORES EN FORMACIÓN EN AGROALIMENTACIÓN	2013
ANÁLISIS DEMOGRÁFICO DEL CABALLO DE LAS RETUERTAS COMO BASE PARA EL DESARROLLO DE SU PROGRAMA DE CONSERVACIÓN	X SIMPOSIO IBEROAMERICANO SOBRE CONSERVACIÓN Y UTILIZACIÓN DE RECURSOS ZOOGÉNÉTICOS. PARAGUAY.	2012
EFEECTO DEL SEMENTAL SOBRE LAS CARACTERÍSTICAS SEMINALES DEL CABALLO DE LAS RETUERTAS	VII CONGRESO IBERICO SOBRE RECURSOS GENETICOS ANIMALES. GIJÓN. ESPAÑA	2010
SUSCEPTIBILITY TO OXIDATIVE STRESS OF THE SPERMATOZOA OF AN ENDANGERED BREED OF HORSES	10º CONGRESO DE LA ASOCIACIÓN ESPAÑOLA DE REPRODUCCIÓN ANIMAL. CÁCERES. ESPAÑA	2010
SITUACIÓN ACTUAL DEL BANCO DE GERMOPLASMA DEL CABALLO DE LAS RETUERTAS	X SIMPOSIO IBEROAMERICANO SOBRE CONSERVACIÓN Y UTILIZACIÓN DE RECURSOS ZOOGÉNÉTICOS. PALMIRA. COLOMBIA	2009
CREACIÓN DE UN BANCO DE GERMOPLASMA EN EL CABALLO DE LAS RETUERTAS. UNA ESTRATEGIA DE CONSERVACIÓN.	IX SIMPOSIO IBEROAMERICANO SOBRE CONSERVACIÓN Y UTILIZACIÓN DE REC ZOOGÉNÉTICOS. MAR DEL PLATA. ARGI	2008
CARACTERIZACIÓN Y CONSERVACIÓN DEL CABALLO DE LAS RETUERTAS	VI CONGRESSO IBERICO SOBRE RECURSOS GENETICOS ANIMAIS. LISBOA. PORTUGAL	2008

10. NOTAS DE PRENSA

Andalucía investiga. 8 de Junio de 2007. El caballo de retuertas de Doñana es la raza de caballos más antigua de Europa y, además, la última que vive en libertad, aislada de otras poblaciones. El hallazgo ha sido descubierto gracias a un estudio genético desarrollado por investigadores del Centro Superior de Investigaciones Científicas en colaboración con el Servicio de Cría Caballar y Remonta del Ministerio de Defensa y la Universidad de Córdoba. Anabel Varela

Elmundo.es. Identifican en Doñana la raza de caballos más antigua de Europa. 01/06/2007

Trofeocaballo.com. Retuerta, casta salvaje. 01/08/2007

Diariocordoba.com. Caballos milenarios en peligro de extinción. Una raza ancestral, autóctona de las marismas de Doñana, sale por primera vez de su hábitat natural para ser estudiada en Córdoba El Centro Agropecuario Provincial será el responsable del proyecto. 26/08/2007 JOSE M. DOMINGUEZ

Celtiberia.net. El caballo de Doñana, la raza más antigua de Europa. 03/06/2007

11. BIBLIOGRAFÍA

Acevedo-Whitehouse K.F., G. Frances, G. Denise y A. William (2003) "Disease susceptibility in California sea lions." *Nature* 422 (6927): 35-35.

Aitken R.J. y B.J. Curry (2011) "Redox Regulation of Human Sperm Function: From the Physiological Control of Sperm Capacitation to the Etiology of Infertility and DNA Damage in the Germ Line." *Antioxidants & Redox Signaling* 14(3): 367-381.

Aitken R.J. y J.S. Clarkson (1987). "Cellular basis of defective sperm function and its association with the genesis of reactive oxygen species by human spermatozoa." *Journal of Reproduction and Fertility* 81(2): 459-469.

Aitken R.J., J K. Wingate, G.N.De Iuliis, E.A.Mc Laughlin (2007) "Analysis of lipid peroxidation in human spermatozoa using BODIPY C11." *Mol Hum Reprod* 13(4): 203-211.

Aitken R.J., K. Jones, y S.A.Robertson (2012) "Reactive Oxygen Species and Sperm Function--in Sickness and in Health." *Journal of Andrology*. 33: 1096-1106.

Aitken R.J., S.Whiting, G.N. De Iuliis (2012) "Electrophilic aldehydes generated by sperm metabolism activate mitochondrial reactive oxygen species generation and apoptosis by targeting succinate dehydrogenase." *J Biol Chem* 287(39): 33048-33060.

Aitken R.J., Z.Gibb, L.A. Mitchell, S.R. Lambourne, H.S. Connaughton, G.N. De Iuliis (2012) "Sperm Motility Is Lost In Vitro As a Consequence of Mitochondrial Free Radical Production and the Generation of Electrophilic Aldehydes but Can Be Significantly Rescued by the Presence of Nucleophilic Thiols." *Biology of Reproduction*.87 (5): 110.

Álamo-Santana, Desiree. (2007) "Crioconservación Viabilidad Espermática en la Especie Canina: Utilización de Nitrógeno Líquido vs Ultracongelador de -152°C". Tesis Doctoral. Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Departamento de Patología Animal, Producción Animal, Bromatología y Tecnología de los Alimentos.

Alvarenga MA, F.O. Papa, F.C. Landim-Alvarenga y A.S. Medeiros (2005) "Amides as cryoprotectants for freezing stallion semen: a review". *Anim Reprod Sci*; 89(1-4):105-13.

Álvarez J., L.J.Royo, L. Pérez-Pardal, I. Fernández, L. Payeras, F. Goyache (2010): "Assessing losses of genetic variability in the endangered Mallorquí horse. Czech" *Journal of Animal Science*. 55. 456-462.

Aranguren, M. (2002) "Caracterización y relaciones filogenéticas de cinco razas asnales españolas en peligro de extinción mediante la utilización de marcadores microsatélites: su importancia en los programas de conservación" Tesis doctoral. Universidad Autónoma de Barcelona, Barcelona.

Ball B.A. y A. Vo (2002). "Detection of lipid peroxidation in equine spermatozoa based upon the lipophilic fluorescent dye C-11-BODIPY581/591." *Journal of Andrology* 23(2): 259-269.

Baumber J y B.A. Ball (2000) "The effect of reactive oxygen species on equine sperm motility. viability. acrosomal integrity. mitochondrial membrane potential. and membrane lipid peroxidation." *Journal of Andrology* 21(6): 895-902.

Bhattacharyya H.K., B.K. Goswami, K.M. Bujarbaruah, B.C Deka, Biswa R.K. (2009) "Collection and characterization of semen in mithun (*Bos frontalis*) bulls" *Theriogenology* 72: 699-703.

Boichard D., L. Maignel y É. Verrier (1997) "The value of using probabilities of gene origin to measure genetic variability in a population". *Genetics Selection Evolution*. 29. 5–23.

Botstein D., R.I. White, M. Skolnich y R. W. Davis (1980) "Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphism" *American Journal of Human Genetics* 32: 324-331.

Buranaamnuay K., R. Grossfeld, C. Struckmann, D. Rath. Influence of cryoprotectants glycerol and amides, combined with antioxidants on quality of frozen-thawed boar sperm. *Animal Reproduction Science* 127. 2011 56-61

Cabrera P., R. Sánchez, y Risopatrón J. (2014) "Selección espermática en semen congelado/descongelado de equino: evaluación de las membranas plasmática, acrosomal y potencial de membrana mitocondrial". *Int. J. Morphol.*, 32(2):725-731.

Carmo M.T. y F.O. Papa (2005). "Improvement of stallion semen post-thaw motility with the association dimethyl formamide and methyl formamide as cryoprotectors." *Animal Reproduction Science* 89(1-4): 286-288.

Cervantes I., A.M. Molina, F. Goyache, J.P. Gutiérrez, M. Valera. (2008): "Population history and genetic variability in the Spanish Arab Horse assessed via pedigree analysis". *Livestock Science*. 113. 24–33.

Chapman, A. y W.J. Buck, (1910): "Unexplored Spain". 498

Christova Y. y P.S. James (2004). "Lipid diffusion in sperm plasma membranes exposed to peroxidative injury from oxygen free radicals." *Molecular Reproduction and Development* 68(3): 365-372.

Cocchia N., M. Pasolinia, R. Mancinib, O. Petrazzuoloc, I. Cristofarod y I. Rosapane (2011). "Effect of SOD (superoxide dismutase) protein supplementation in semen extenders on motility, viability, acrosome status and ERK (extracellular signal-regulated kinase) protein phosphorylation of chilled stallion spermatozoa". *Theriogenology* 75(1): 1201–1210.

Cochran, J.D., R.R. Amann, D.P. Froman, B.W. Picket (1984) "Effects of centrifugation, glycerol level, cooling to +5°C, free-zing rate and thawing rate in the post-thaw motility of equine sperm". *Theriogenology*, 22, 25-38.

Comizzoli P., P. Mermillod, X. Legendre, N. Chai, y R. Mauget (2000). "In vitro Production of embryos in the red deer (*Cervus elaphus*) and the sila deer (*Cervus Nippon*)". *Theriogenology* 53, 327.

Crespo García, M.J. (2003) "Conservación —*Ex Situ* , mediante la utilización de técnicas de reproducción animal asistida, y tipificación genética de las razas bovinas Tudanca y Monchina en Cantabria". (disponible en www.cifacantabria.com).

Cristanelli M.J., E.L. Squires, R.P. Amann y B.W. Pickett (1984) "Fertility of stallion semen processed, frozen and thawed by a new procedure". *Theriogenology*. 22-39.

Daigneault B.W., J.K. Graham, J.E. Bruemmer, D.J. Denniston, E.M. Carnevale (2012) "Cryopreservation of Cooled Semen and Evaluation of Sperm Holding Media for Potential Use in Equine-Assisted Reproduction Procedures". *Journal of Equine Veterinary Science* 32: 569-574

Day J.G. y Stacey, G. (2007). *Cryopreservation and freeze-drying protocols* (Vol. 368). Springer Science & Business Media.

Delgado J.V., C. Barba, M.E. Camacho, F.T.P.S. Sereno, A. Martínez y J.L. Vega-Plá. (2001) "Caracterización de los animales domésticos en España". AGRI-FAO 29:7-18.

Dott, H.M., G.C.Foste, (1979) The Estimation of Sperm Motility in Semen, on a Membrane Slide, by Measuring the Area Change Frequency With an Image Analyzing Computer. J Reprod Fertil. 55: 161-166.

Druml T., R.Baumung, J.Sölkner (2009) "Pedigree analysis in the Austrian Noriker draught horse: genetic diversity and the impact of breeding for coat colour on population structure". Journal of Animal Breeding and Genetics. 126. 348–356.

Ebel Barrera y F. Andrea (2012). "Caracterización y pruebas de congelabilidad seminal en asnos Baudet duPoitou". Proyecto fin de carrera. Valdivia, Chile.

Ecot. P.y G. Decuadro-Hansen (2005). "Evaluation of a cushioned centrifugation technique for processing equine semen for freezing." Animal reproduction science 89(1-4): 245-248.

FAO (1998a) "Primer documento de líneas directrices para la elaboración de planes nacionales de gestión de los recursos genéticos de los animales de granja". FAO ed. Roma. 146.

FAO (1998b) "Primer documento de líneas directrices para la elaboración de planes nacionales de gestión de los recursos genéticos de los animales de granja. Control de rendimientos animales para ambientes de producción de medianos ingresos". FAO ed. Roma. 112.

Fries R., A. Eggen y G. Stranzinger (1990) "The bovine genome contains polymorphic microsatellites". Genomics 8:403-6.

Gadea-Mateo Joaquin (1997) "Predicción de la fertilidad *in vivo* de los eyaculados de verraco mediante parámetros rutinarios de contrastación seminal, pruebas bioquímicas y el test homólogo de penetración *in vitro*". Tesis Doctoral. Universidad de Murcia, Facultad de Veterinaria.

Gallardo Bolaños J.M., A. Miró Morán, C.M. Balao Da Silva, A.Morillo Rodríguez, M. Plaza Dávila, I.M. Aparicio, J.A. Tapia, C. Ortega Ferrusola,F.J. Peña (2012). "Autophagy and Apoptosis Have a Role in the Survival or Death of Stallion Spermatozoa during Conservation in Refrigeration." Plos One 7(1).

Gandini G. y F. Pizzi (2007) "The costs of breed reconstruction from cryopreserved material in mammalian livestock species." Genet Sel Evol 39(4): 465-479.

Garcia B.M. y A.M. Moran (2011) "The Mitochondria of Stallion Spermatozoa Are More Sensitive Than the Plasmalemma to Osmotic-Induced Stress: Role of c-Jun N-terminal Kinase (JNK) Pathway." Journal of Andrology 33(1): 105-113.

Garcia B.M., L.G. Fernandez (2011) "Membrane Lipids of the Stallion Spermatozoon in Relation to Sperm Quality and Susceptibility to Lipid Peroxidation." Reproduction in Domestic Animals 46(1): 141-148.

Garner D.L, D. Pinkel, L.A. Johnson, M.M. Pace (1986) Assessment of spermatozoal function using dual fluorescent staining and flow cytometric analyses. Biol reprod. 34:127–138.

Garner D.L, L. A. Johnson (1995) "Viability Assessment Of Mammalian Sperm Using Sybr-14 And Propidium Iodide". Biol Reprod 53: 276–84.

Gibb Z., L.H.A. Morris, W.M.C. Maxwell y C.G. Grupen (2010) "Dimethyl formamide improves the post-thaw characteristics of sex-sorted and non-sorted stallion spermatozoa". *Animal Reproduction Science* 1215. 2010. S216-S217

Gibba Z, L.H.A Morrisb, W.M.C Maxwella, C.G.G. (2010) "Dimethyl formamide improves the postthaw characteristics of sex-sorted and nonsorted stallion spermatozoa". *Anim Reprod Sci*; 121(1-2):216-7.

Gillan L., G. Evans, W.M.C. Maxwell (2005) "Flow Cytometric Evaluation of Sperm Parameters in Relation to Fertility Potential". *Theriogenology* 63: 445–457.

Goldenberger D. y I. Perschil (1995). "A simple *universal* DNA extraction procedure using SDS and proteinase K is compatible with direct PCR amplification." *PCR Methods Appl* 4(6): 368-370.

Goldstein D.B., y D.D. Pollock (1997) "Launching Microsatellites: A Review of Mutation Processes and Methods of Phylogenetic Inference". *J Hered* 88:335-342.

Gomendio M. y J. Cassinello(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." *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences* 267(1446): 875-882.

Gomes G.M., J.C.F. Jacob, A.S. Medeiros, F.O. Papa, M.A.(2002) "Alvarenga. Improvement of stallion spermatozoa preservation with alternative cryoprotectants for the Mangalarga Marchador breed" *Theriogenology* 2002; 58:2.

Goyache F., J.P. Gutiérrez, I. Fernández, E. Gomez, I. Alvarez, J.Díez y L.J. Royo (2003) "Using pedigree information to monitor genetic variability of endangered populations: the Xalda sheep breed of Asturias as an example". *Journal of Animal Breeding and Genetics*. 120. 95–105.

Graham, J.K. (1996) "Cryopreservation of stallion spermatozoa". *Vet. Cli. North Am. Eq. Pract.* 12, 131-147.

Gross, D.S. y W.T. Garrard (1986) "The ubiquitous potentialZ-forming sequence of eucaryotes, (dT-dG)_n * (dCdA)_n, is not detectable in the genomes of eubacteria". *Mol.Cell. Biol.* 6:3010-3013.

Guo S.W. y E.A. Thompson (1992) "Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles." *Biometrics* 48(2): 361-372.

Gutiérrez J.P., Cervantes I., Goyache F. (2009) "Improving the estimation of realized effective population sizes in farm animals". *Journal of Animal Breeding and Genetics*. 126. 327–332.

Hafez E.S.E. y B. Hafez (2000) "Reproducción e inseminación artificial en animales". Mc graw hill interamericana.

Hammerstedt R.H., J.K. Graham y J.P. Nolan (1990) "Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive". *J Androl* 1990; 11(1):73-88.

Hidalgo M. (2004) "Estudio del efecto de la congelación-descongelación sobre los parámetros morfológicos del espermatozoide del macho cabrío". Universidad de Córdoba. Departamento de medicina y cirugía animal. Unidad de reproducción y obstetricia. Tesis doctoral

Hoffmann N., H. Oldenhof, C. Morandini, K. Rohn y H. Sieme (2011) "Optimal concentrations of cryoprotective agents for semen from stallions that are classified 'good' or 'poor' for freezing". *Anim. Reprod. Sci.*, 125(1-4):112-8, 2011.

ICAR. (2007) "International agreements of recording practices". ICAR Recording Guidelines. ICAR Ed. Roma: 514.

Ijaz A., V. Ducharme (1995) "X Effect of various extenders and taurine on survival of stallion sperm cooled to 5°C". *Theriogenology*, v.44, p.1039-1050.

Jarne P.P., Lagoda (1996) "Microsatellites, from molecules to populations and back". *Trends in Ecology and Evolution* 11:424-429.

Johnson L.A. (1995) "Sex preselection by flow cytometric separation of x and y chromosome-bearing sperm based on DNA difference: A review" *Reprod. fertil. dev.* 7: 893-903.

Kankofer M., G. Kolm, J. Aurich y C. Aurich (2005) "Activity of glutathione peroxidase, superoxide dismutase and catalase and lipid peroxidation intensity in stallion semen during storage at 5 °C. *Theriogenology*. 63 (5):1354-65.

Keeler K.D., N.M. Mackenzie y D. Dresser (1983) "Flow cytometric sorting of living human spermatozoa". *J. Reprod. Fert.* , 68: 205.

Kikutani H. y T. Taga (1985) "Effect of B cell differentiation factor (BCDF) on biosynthesis and secretion of immunoglobulin molecules in human B cell lines." *J Immunol* 134(2): 990-995.

Kimpton C.P., P.Gill, A.Walton, A. Urquhart, E.S. Millican, y M. Adams (1993) "Automated DNA profiling employing multiplex amplification of short tandem repeat loci". *PCR Methods and Applic* 3: 13-22.

Koreth J., y J.O.D. McGee (1996) "Review Article. Microsatellites and PCR Genomic Analysis". *The Journal of Pathology* 178:239-248.

Leite C.M., M.A. Alvarenga, M.T. do Carmo, H.N. Ferreira, M.R. Souto Maior, R. de Almeida Torres Filho, A.L. Rios Rodrigues, F. Zandonadi Brandão (2012) "Semen cryopreservation protocols of Mangalarga Marchador stallion". *R. Bras. Zootec.*, v.41, n.9, p.1989-1995.

Lindsey A., J. Schenk y J. Graham (2002) "Hysteroscopic insemination of low numbers of flow sorted fresh and frozen/thawed stallion spermatozoa". *Equine Veterinary Journal* 34, 121-127.

Lömker, R. y D.L. Simon (1994) "Costs of and inbreeding in conservation strategies for endangered breeds of cattle". *Proceedings of the 5th World Congress of Genetics Applied to Livestock Production*, Guelph, Canada, August 1994, 21, 393-396.

Loomis P.R. y J.K. Graham (2008) "Commercial semen freezing: Individual male variation in cryosurvival and the response of stallion sperm to customized freezing protocols." *Animal Reproduction Science* 105(1): 119-128.

Lopes K.R.F., L.L.M. Costa, G.L. Lima, A.L.P. Souza, A.R. Silva (2009) "Dimethylformamide is no better than glycerol for cryopreservation of canine semen". *Theriogenology* 72. 2009.650-654

Macías García B., L. González Fernández, C. Ortega Ferrusola, A. Morillo Rodríguez, J.M. Gallardo Bolaños, J.M. Rodríguez, H. Martínez, J. A. Tapia, D. Morcuende, y F.J. Peña (2011) "Fatty acids

and plasmalogens of the phospholipids of the sperm membranes and their relation with the post-thaw quality of stallion spermatozoa". *Theriogenology*, 75(5):811-8.

Maignel L., D. Boichard, E. Verrier (1996) "Genetic variability of French dairy breeds estimated from pedigree information". *Interbull Bulletin*. 14. 49–54.

Martínez A.M., J.V. Delgado, A. Rodero y J.L. Vega Pla (2000) "Genetic structure of Iberian pig breed using microsatellites". *Animal Genetics* 31:295-301.

Martínez-Pastor F., M. Mata-Campuzano, M. Álvarez-Rodríguez, M. Álvarez, L. Anel y P. Paz (2010) "Probe and Technique for Sperm Evaluation by Flow Cytometry". *Reprod Dom Anim*. 45:(suppl 2) 67-78.

Medeiros A.S., G.M. Gomes, M.T. Carmo, F.O. Papa y M.A. Alvarenga (2002) "Cryopreservation of stallion sperm using different amides" *Theriogenology* 58:4.

Miró-Arias M. A. De Santiago, C. Alvarado, A. Vallecillo, F. Crespo y J.L. Vega-Pla (2009) "Situación actual del Banco de Germoplasma del Caballo de las Retuertas". *Memorias del X Simposio Iberoamericano sobre Conservación y Utilización de Recursos Zoogenéticos*: 507 – 509.

Miró-Arias M., J.M. León, A. Vallecillo, C. Barba, S. Nogales y J.L. Vega-Pla (2012) "Análisis demográfico del Caballo de las Retuertas como base para el desarrollo de su Programa de Conservación." *AICA* 2(360): 147-150.

Mommens B.G., L.J. Peelman, A. Van Zeveren, G.D. Ieteren y N. Wissocq (1999) "Microsatellite variation between an African and five European taurine breeds results in a geographical phylogenetic tree with a bison outgroup". *Journal of Animal Breeding and Genetics* 116:325-330

Montoya C. y D. Arias (2005) "Caracterización molecular de materiales *Elaeisis guineensis* Jacq. Procedentes de Angola." *Fitotecnia Colombiana* 5(2): 1-10.

Mortimer S.T. (2000) "CASA - Practical Aspects". *J. Androl*; 21: 515-524.

Mortimer, S. T. 1997. A Critical Review of the Physiological Importance and Analysis of Sperm Movement in Mammals. *Hum Reprod Update*. 3: 403–439.

Mosqueira Podestá, Trinidad Josefina (2012) "Evaluación de los efectos de diluyentes de congelación de semen sobre la capacidad de unión de espermatozoides equinos a zona pelúcida de ovocitos bovinos". Proyecto fin de carrera. Valdivia, Chile.

Moureaux S., J.L.Verrier, A. Ricard y J.C.Mériaux (1996) "Genetic variability within French race and riding horse breeds from genealogical data and blood marker polymorphisms". *Genetics Selection Evolution*. 28. 83–102.

Muñoz Bort D. (2004) "La ganadería caballar en la Villa de Almonte. Introducción histórica". Ed. Ayuntamiento de Almonte. Almonte. 150

Nei M. (1973) "Analysis of Gene Diversity in Subdivided Populations." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 70(12): 3321-3323.

Nei M. (1987) "Molecular Evolutionary genetics" Columbia University Press, New York.

Nordheim A y A Rich (1983) "Negatively supercoiled simian virus 40 DNA contains Z-DNA segments within transcriptional enhancer sequences". *Nature* 303: 674-679.

Olds-Clarke P. (1996) "How does poor motility alter sperm fertilizing ability?" *J Androl* 17(3): 183-186.

Oliveira E.J., J.G. Pádua, M.I. Zucchi, R. Vencovsky, y M.L.C. Vieira (2006) "Origin, evolution and genome distribution of microsatellites". *Genetics and Molecular Biology* 29:294-307.

Ormerod M.G. y X.M. Sun (1993) "Increased Membrane-Permeability of Apoptotic Thymocytes - a Flow Cytometric Study." *Cytometry* 14(6): 595-602.

Ortega Ferrusola C. y L.G. Fernández (2009) "Lipid peroxidation assessed with BODIPY-C-11. increases after cryopreservation of stallion spermatozoa. is stallion-dependent and is related to apoptotic-like changes." *Reproduction* 138(1): 55-63.

Ortega Ferrusola C. y L.G. Fernández (2010) "Inhibition of the mitochondrial permeability transition pore reduces "apoptosis like" changes during cryopreservation of stallion spermatozoa." *Theriogenology* 74(3): 458-465.

Ortega-Ferrusola C., B.M. Garcia, J.M. Gallardo-Bolaños , L. González-Fernández , H. Rodríguez-Martinez , J.A. Tapia y F.J. Peña (2009) "Apoptotic markers can be used to forecast the freezeability of stallion spermatozoa." *Animal Reproduction Science* 114(4): 393-403.

Ortega-Ferrusola C., Y. Sotillo-Galan, E. Varela-Fernández, J.M. Gallardo-Bolaños, A. Muriel, L. González-Fernández, J.A. Tapia y F.J. Peña (2008) "Detection of "Apoptosis-Like" changes during the cryopreservation process in equine sperm." *Journal of Andrology* 29(2): 213-221.

Palma G.A., D.J.Tortonesi y F. Sinowatz (2001) "Development capacity in vitro of prepubertal oocytes." *Anat. Histol. Embryol* 30, 1-6.

Parland S., J.F.Kearney, M.Rath y D.P. Berry (2007) "Inbreeding trends and pedigree analysis of Irish dairy and beef cattle populations". *Journal of Animal Science*. 85. 322-331.

Pegg D.E. (2007) "Principles of cryopreservation". In: *Cryopreservation and freeze-drying protocols* (pp. 39-57). Humana Press.

Peinado B. y A. Poto (2003) "IV curso internacional sobre la conservación y utilización de las razas de animales domésticos locales en sistemas de explotación tradicional". Libro electrónico. ISBN 84-95609-26-6. España.

Peña F.J., B.M. García, J.C. Samper, I.M. Aparicio, J.A. Tapia y C.Ortega. (2011) "Dissecting the molecular damage to stallion spermatozoa: The way to improve current cryopreservation protocols?". *Theriogenology*, 76(7), 1177-1186.

Pena F.J., C. Ortega, J.A. Tapia, e I.M. Aparicio, (2012). "How Stallion Sperm Age In Vitro? Scenario for Preservation Technologies." *Journal of Equine Veterinary Science* 32(8): 451-454.

Pena F.J., F. Saravia, A. Johannisson, M. Walgren y H. Rodríguez - Martínez (2005) "A new and simple method to evaluate early membrane changes in frozen-thawed boar spermatozoa." *International Journal of Andrology* 28(2): 107-114.

Pérez J., F. Mello, G. Juliani, M. Lagares, L. Lago y M. Henry. (2008) "Effect on post-thaw viability of equine sperm using stepwise addition of dimethyl formamide and varying cooling and freezing procedures". *Animal Reproduction Science* 5(3-4): 103-109.

Pjontek J., O. Kadlečík, R. Kasarda, M. Horny (2012) "Pedigree analysis in four Slovak endangered horse breeds" *Czech J. Anim. Sci.* 57: 54–64.

Pritchard J.K., M. Stephens, y P. Donnelly (2000) "Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data". *Genetics* 155:945-959.

Raymond M., y F. Rousset (1995) "GENEPOP (version 1.2): A population genetics software for exact test and ecumenicism." *Journal of Heredity* 86: 248-249.

Reid J. M., y P. Arcese (2003) "Inbreeding depresses immune response in song sparrows (*Melospiza melodia*): direct and inter-generational effects." *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences* 270(1529): 2151-2157.

Restrepo Betancur G., D. Ocampo, A.Velásquez (julio-diciembre 2013) "Evaluación de la movilidad del semen criopreservado de caballos criollo colombiano por un sistema analizador de clase". *Rev. U.d.ca act. & div. Cient.* 16(2):445-450.

Restrepo Betancur G., J.E. Duque Cortés y J.D. Montoya Páez (2012) "Effect of Two Protocols of Cryopreservation on Fertilizing Capacity of Stallion (*Equus caballus*) Semen". *Rev.Fac.Nal.Agr.Medellín* 65(2): 6711-6718.

Rodero A., J.V. Delgado, y E. Rodero (1992) "Primitive Andalusian livestock and their implications in the Discovery of America". *Arch. Zoot.* 41(154 Ex):64-73.

Rodriguez A. M., C. Ortega Ferrusola, B. M García, J.M Morrell, H.R. Martínez, J.A.Tapia y F.J. Peña (2011) "Freezing stallion semen with the new Cáceres extender improves post thaw sperm quality and diminishes stallion-to-stallion variability." *Animal Reproduction Science* 127(1-2): 78-83.

Roldan E.R. y M. Gomendio (2006) "Inbreeding and reproduction in endangered ungulates: preservation of genetic variation through the Organization of Genetic Resource Banks." *Reprod Domest Anim* 41 Suppl 2: 82-92.

Roldan E.R.S. y J. Cassinello (1998) "Inbreeding, fluctuating asymmetry, and ejaculate quality in an endangered ungulate." *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences* 265(1392): 243-248.

Rota A., B. Ström, C. Linde-Forsberg y Rodriguez-Martinez H (1997) "Effects of Equex STM paste on viability of frozen-thawed dog spermatozoa during in vitro incubation at 38°C" *Theriogenology* 47 1093–1101

Saiki I. y S. Sone (1985) "Synergism between human recombinant gamma-interferon and muramyl dipeptide encapsulated in liposomes for activation of antitumor properties in human blood monocytes." *Cancer Res* 45(12 Pt 1): 6188-6193.

Salamon, s.; w.m.c. Maxwell. 2000. Storage of Ram Semen. *Animal Reproduction Science* 62: 77–111

Salazar J.L. y S.R. Teague (2011) "Effect of cryopreservation protocol on postthaw characteristics of stallion sperm." *Theriogenology* 76(3): 409-418.

Samper J.C., A.J. Estrada y A.O. Mackinnon (2007) "Insemination with frozen semen. In Current" *Therapy in Equine Reproduction.* 285-289.Eds JC Samper. JF Pycock and AO Mackinnon. St Louis. MO: Saunders Elsevier.

Shanis B.S., J.H. Check, A. Bollendorf (1989) "Interpretation and Misinterpretation of Semen Parameters". *Archives of Andrology*. 23:213-217.

Shete S., H. Tiwari y R.C. Elston (2000) "On Estimating the Heterozygosity and Polymorphism Information Content Value". *Theoretical Population Biology* 57:265.

Soler C., J. Nuñez, M. Nuñez, M. Sancho, R. Gutierrez (2008) "El Análisis Computarizado del Semen y sus Aplicación a la Mejora de la Reproducción Asistida". *Revista FEAGAS* Nº 34. Año XVI. Julio - Diciembre.

Squires E.L., S.L. Keith y J.K. Graham (2004) "Evaluation of alternative cryoprotectants for preserving stallion spermatozoa". *Theriogenology*, 62(6):1056-65.

Starr C. y R. Taggart (2004) "Biología 2. La Unidad y Diversidad de la Vida". *Theriogenology*, 63(5): 1354–1365.

Ticiano Guimarães Leite, Vicente Ribeiro do Vale Filho, Rubens Paes de Arruda, André Furugen Cesar de Andrade, Lucas Luz Emerick, Fabiane Gilli Zaffalon, Jorge André Matias Martins, Venício José de Andrade (2010) "Effects of Extender and Equilibration Time on Post-Thaw Motility and Membrane Integrity of Cryopreserved Gyr Bull Semen Evaluated by CASA and Flow Cytometry". *Animal Reproduction Science* 120: 31–38.

Vallecillo A., M. Miró-Arias, A. Cabello, y J.L. Vega-Pla (2008 b) "Creación de un Banco de Germoplasma en el Caballo de las Retuertas". *Una Estrategia de Conservación. Memorias IX Simposio Iberoamericano sobre Conservación y Utilización de Recursos Zoogenéticos Tomo II: 501 - 503*

Vallecillo A., M. Miró-Arias, J.L. Vega-Pla, A. Cabello y J. Calderón (2008 a) "Caracterización y Conservación del Caballo De Las Retuertas". *VI Congreso Iberico Sobre Recursos Geneticos Animais: 40*

Van Eldik P.E.H. y Van der Waaij (2006) "Possible negative effects of inbreeding on semen quality in Shetland pony stallions." *Theriogenology* 65(6): 1159-1170.

Vega-Pla J.L., J. Calderón, P.P. Rodríguez-Gallardo, A. Martínez y C. Rico. (2006) "Saving feral horses: Does it really matter? A case study of wild horses from Doñana National Park in southern Spain". *Animal Genetics* 37:571-578.

Vega-Pla J.L., J. Calderón, P.P. Rodríguez-Gallardo, B. Alcalde, F.T.P.S. Sereno, M.R. Costa, E. Pérez-Pineda, J.V. Delgado y C. Rico (2005) "The Retuertas horse: the *missing link* in the Iberoamerican horse breed origin?" *Conservation Genetic of endangered horse breeds*. Ed. I. Bodó, L. Alderson y B. Langlois. Wageningen Pers. 167-176.

Vidament M. y J.M. Yvon (2001). "Advances in cryopreservation of stallion semen in modified INRA82." *Anim Reprod Sci* 68(3-4): 201-218.

Vidament M. y P. Ecot (2000) "Centrifugation and addition of glycerol at 22 degrees C instead of 4 degrees C improve post-thaw motility and fertility of stallion spermatozoa". *Theriogenology* 54(6): 907-919.

Vidament M., C. Daire, J.M. Yvon, P. Doligez, B. Bruneau y M. Magistrini (2002) "Motility and fertility of stallion semen frozen with glycerol and/or dimethyl formamide". *Theriogenology*, 58:249-51

Watson P.F. y G.J. Morris (1987) "Cold Shock Injury in Animal Cells". In: Bowler K, Fuller BJ, (ed), *Temperature and Animal Cells*. Company of Biologists Limited, Cambridge. 311-340.

Weiss S, F. Janett, D. Burger, R. Thun (2004) "The influence of centrifugation on quality and freezability of stallion semen". *Schweiz Arch Tierheilkd.* 146: 285-93.

Wright S. (1943) "Isolation by distance". *Genetics* 28(2): 114-138.

Wright S. (1978) "Evolution and the Genetics of Populations" The University of Chicago Press. *Journal of Human Evolution*, Volume 9, Issue 2, 157.

Wronski R. y N. Golob (2002) "Two-color. fluorescence-based microplate assay for apoptosis detection." *Biotechniques* 32(3): 666-668.

**TÍTULO DE LA TESIS:**

Análisis demográfico y caracterización seminal del Caballo de las Retuertas de Doñana

DOCTORANDO/A:

María Miró Arias

INFORME RAZONADO DEL/DE LOS DIRECTOR/ES DE LA TESIS

(se hará mención a la evolución y desarrollo de la tesis, así como a trabajos y publicaciones derivados de la misma).

El Caballo de las Retuertas se encuentra en semilibertad en la Reserva Biológica de Doñana. Se capturan los ejemplares cada año para tomar muestras de sangre e identificar los potros, el resto del año vagan libremente en un espacio de una 6000 hectáreas. La población es pequeña y el número está controlado para que no compita con otras especies de la Reserva. Esta circunstancia hace que sea muy interesante analizar la evolución de la población desde un punto de vista demográfico. Cada año se analizan las muestras con un panel de microsatélites (secuencias del DNA) para comprobar la genealogía y la evolución de los apareamientos realizando asignación de padres y madres mediante análisis estadísticos de asignación. Esta labor ha hecho que el desarrollo experimental de la tesis se alargase durante varios años.

Por otro lado se capturaron cuatro machos jóvenes y se trasladaron al Centro Agropecuario de Córdoba con el fin de entrenarlos como donantes de esperma. Se hizo una caracterización seminal para comprobar si el semen reunía las características necesarias para su conservación. Estas pruebas se hicieron en la Facultad de Veterinaria de Extremadura. Finalmente se pudo hacer un banco de germoplasma que garantiza una posible recuperación de la raza ante una catástrofe sanitaria.

Se han ido haciendo publicaciones científicas a medida que se iban obteniendo resultados:

Pérez Rico A., Crespo Castejón F., Sanmartín Sánchez L., **Miró Arias M^a**, Vega Pla JL. Selección de genes de referencia en semen equino criopreservado para su uso en estudios de expresión genética con la técnica de PCR cuantitativa. Sanid. mil. 2014; 70 (1): 20-29; ISSN: 1887-8571

Miró-Arias M., León J.M., Vallecillo A., Barba C., Nogales S., Vega-Pla J. L. Análisis demográfico del caballo de Las Retuertas como base para el desarrollo de su programa de conservación. AICA 2 (2012) 147147-150

Maria Miró-Arias, Juan Maria Gallardo Bolaños, Antolin Morillo-Rodríguez, Carolina Balao da Silva, Ines Maria Aparicio, Jose Antonio Tapia, Angel Vallecillo, Jose Luis Vega-Pla, Fernando Juan Peña Vega, Cristina Ortega Ferrusola. Sperm Susceptibility to Oxidative Stress in the Retuertas Endangered Horse. Journal of Equine Veterinary Science. (2013) Volume 33, Issue 11, Pages 962–968

E. Varela, **M. Miró**, C Ortega Ferrusola, C Silva, A.Miró, B. Macías García, C. Silva, A. Vallecillo, C. Berrocal, J.M. Gallardo Bolaños, A. Morillo, J.A. Tapia, J.L. Vega-Plá, F.J. Peña. Susceptibility to oxidative stress of the spermatozoa of an endangered breed of horses. *Reprod. Dom. Anim.* 45 (Suppl. 2), 79,102 (2010)

Presentaciones en congresos

Efecto del semental sobre las características seminales del caballo de las retuertas. VII Congreso Iberico sobre Recursos Geneticos Animales. Gijón. España (2010)

Susceptibility to oxidative stress of the spermatozoa of an endangered breed of horses. 10º Congreso de La Asociación Española De Reproducción Animal. Cáceres. España (2010)

Situación actual del banco de germoplasma del caballo de las retuertas. X Simposio Iberoamericano sobre Conservación y Utilización de Recursos Zoogenéticos. Palmira. Colombia (2009)

Por todo ello, se autoriza la presentación de la tesis doctoral.

Córdoba, 17 de noviembre de 2015

Firma del/de los director/es

Fdo.: Jose Luis Vega Pla

Fdo.: Jose Manuel León Jurado