

## Citogenética clásica y molecular en equinos.

Daniela Estévez<sup>1-3</sup>, Enrique Género<sup>1-2-3-4</sup>

<sup>1</sup> Cátedra Mejora y Conservación de Recursos Genéticos. Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Lomas De Zamora.

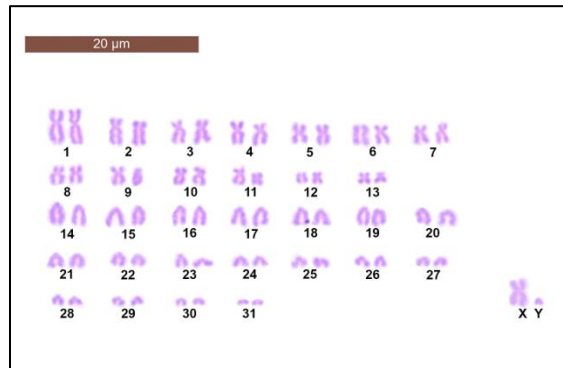
<sup>2</sup> Cátedra Genética. Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Lomas De Zamora.

<sup>3</sup> IIPAAS: Instituto de Investigación sobre Producción Agropecuaria, Ambiente y Salud.

<sup>4</sup> Cátedra Genética de Poblaciones Facultad de Ingeniería y Ciencias Agrarias. Pontificia Universidad Católica Argentina.

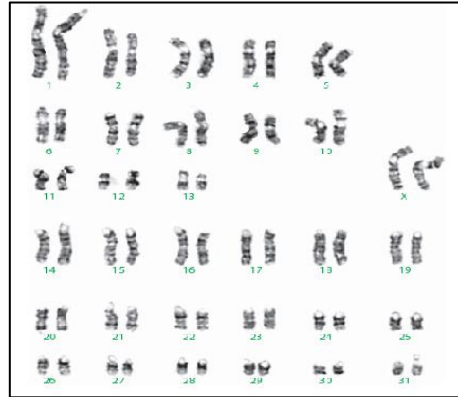
### Introducción

Los primeros trabajos realizados en citogenética de equinos intentaron determinar el número de cromosomas utilizando tejido. Pero no fue hasta que Rothfels *et al.* (1959) determinaron a través del análisis de células cultivadas que el número correcto de cromosomas diploides en equinos era de  $2n = 64$  (Figura 1). Estudios posteriores confirmaron estos hallazgos mediante análisis citogenético (Benirschke *et al.*, 1962; Trujillo *et al.*, 1962; Makino *et al.*, 1963)



**Figura 1.** Cariotipo  $2n=64$  XY. Tinción Fucsina -Carboy

Fue entonces que para poder determinar cada cromosoma en particular se comienzan a utilizar técnicas de bandeo cromosómico; previo acuerdo de una estandarización por parte de la comunidad de citogenética equina. Para ello, se realizaron varios talleres para estandarizar la nomenclatura de los cromosomas de caballo con bandas, que finalmente concluyeron en los ideogramas con bandas G y R en los Coloquios Norteamericanos y Europeos sobre Citogenética de Animales Domésticos (ISCNH, 1997). Esto permitió a los citogenetistas utilizar estándares para la identificación de cromosomas tanto en el análisis citogenético como en el desarrollo de los mapas de genes físicos que iban a venir. (Figura 2)



**Figura 2.** Cariotipo normal  $2n=64$  con Bandeo G (Lear, 2008)

El principal impulso provino de los investigadores y propietarios de caballos preocupados por los reproductores infértiles o subfértiles. El deseo de los criadores de determinar la base genética de los problemas de fertilidad condujo al descubrimiento de diversas alteraciones citogenéticas en equinos. La mayoría de las anomalías involucran los cromosomas sexuales, como es el caso de los seres humanos y otras especies. Cuando los veterinarios llegaron a reconocer el valor de la citogenética clínica, se investigaron más casos y se descubrieron otras anomalías cromosómicas (Lear, 2008)

### **Alteraciones cromosómicas**

#### *Aneuploidía del cromosoma sexual*

En la década del 60', sin técnicas de bandeo, la identidad de cada cromosoma era incierta, por ello los estudios realizados sobre caballos con desarrollo sexual anormal no tenían un diagnóstico preciso. En la mayoría de los casos fue difícil definir la anomalía cromosómica porque los cromosomas no eran identificables individualmente. De todas maneras, los caballos intersexuales, por ejemplo, se describieron en numerosos informes (Bornstein, 1967; Payne *et al.*, 1968; Basrur *et al.*, 1969; 1970; Gerneke y Coubrough, 1970; Bouters *et al.*, 1972). Pero no fue hasta principios de los años setenta que se desarrollaron los métodos de bandas cromosómicas y fue posible determinar qué cromosomas contribuyen a los cariotipos anormales de los caballos y, por tanto, a los fenotipos anormales (Caspersson *et al.*, 1970; Arrighi y Hsu, 1971; Dutrillaux y Lejeune, 1971; Sumner *et al.*, 1972).

Los primeros trabajos de anomalías citogenéticas en caballos describieron la monosomía del cromosoma sexual, la reversión del sexo XY o alguna forma de mosaicismo del cromosoma sexual (Chandley *et al.*, 1975; Hughes *et al.*, 1975; Blue *et al.*, 1978).

En 1990 Power realizó una revisión de los caballos con anomalías cromosómicas, sobre un total de 392 casos determinó que el 36% eran 63, X, 27,8% eran 64, XY reversión sexual y 29,8%, mosaicos sexuales con 63, X/64, siendo XX la forma más común.

Se han descrito otras formas de anomalías cromosómicas sexuales, Bowling *et al.* (1987) informaron casos de delección Xp, Power (1987) describió una translocación desequilibrada causando una pérdida de porción de Xp [64, X, -X, + der (X), t (X; 15q)] en una yegua estéril pura sangre con baja estatura, mala conformación y un paso rígido. Mäkelä (1994) informó una delección de cromosoma X para una potra Standardbred de estatura pequeña, musculatura pélvica deficientemente desarrollada, senos frontales agrandados, hocico arrugado, ovarios pequeños, inclinación de la cabeza, vacuolas en lentes oculares que hacen ciego nocturno e isocromosoma X [64, X, i Xq)]. Disomías del cromosoma Y se han informado únicamente en tres caballos y sólo en un animal se ha visto una forma de mosaico con monosomía del cromosoma X (63, X / 65, XYY) (Höhn *et al.*, 1980; Herzog *et al.*, 1989; Paget *et al.*, 2001).

El síndrome de Klinefelter fue reportado por Mäkinen *et al.*, (2000) en un semental de 65, XXY Trotter francés con comportamiento sexual normal, pequeños testículos blandos, pene pequeño y azoospermia; también en un trotón Standardbred con testículos normales, sin espermatozoides y un cariotipo mosaico de 64, XY / 65, XXY.

Es de destacar que hasta el año 2007 el porcentaje de caballos con anomalías cromosómicas dentro de la población general era desconocido, pero un trabajo realizado por Bugno *et al.*, (2007) determinó que el 2% de la población general tenía una anomalía cromosómica. Se estudiaron un total de 500 animales hembras y machos de diferentes razas en Polonia, como resultado de este estudio, en las hembras el 3,7% presentó una anomalía cromosómica, de las 272 yeguas estudiadas 10 presentaron diferentes anomalías cariotípicas, 1 mostró quimerismo cromosómico (64, XX / 64, XY), 8 tenían aneuploidía cromosómica sexual (una en línea pura 63, X y siete en forma de mosaico 63, X / 64, XX) y 1 presentó aneuploidía autosómica con mosaicismo (64, XX / 65, XX, + 31).

#### *Síndromes de sexo reverso*

Estos no son verdaderas anomalías cromosómicas ya que no hay cambios en el número ni en la estructura de los cromosomas, lo que sucede es que en el diagnóstico citogenético se determina un sexo, por ejemplo XY (macho) pero el fenotipo del individuo corresponde a una hembra. En la actualidad estos casos se pueden detectar mediante citogenética molecular con la utilización de sondas. Existen además casos de animales portadores de estas alteraciones genéticas que no presentan cambios fenotípicos externos (Anaya *et al.*, 2014). Es por ello que muchos animales permanecen sin diagnosticar.

En los caballos, el tipo más común parece ser XY sexo reverso donde el caballo es una hembra fenotípica pero su genotipo es masculino. Los caballos de reversión sexual XY pueden tener un fenotipo variado que puede ir desde una yegua muy femenina con un tracto reproductivo dentro de los límites normales hasta una yegua muy masculinizada con comportamiento estral variable. Las diferencias en el fenotipo pueden reflejar el tipo de anomalía genética que está presente. Se han descrito patrones familiares de herencia,

particularmente en ciertas líneas de caballos árabes (Kieffer *et al.*, 1976; Kent *et al.*, 1986; Bowling *et al.*, 1987).

Sólo se ha notificado un caso de síndrome de reversión del sexo con SRY-positivas 64, XY en una yegua de pura raza infértil con comportamiento masculino (Switonski *et al.*, 2005). Ambos SRY y ZFY estaban presentes y parecían ser normales mediante la secuenciación del ADN. Se teorizó que el fenotipo de esta yegua era una insensibilidad a los andrógenos causada por una mutación en un receptor de andrógenos (síndrome de feminización testicular). Buoen *et al.*, (2000) resumieron muy bien numerosos informes de la reversión del sexo de 64, XX que se producen en muchas razas diferentes. Los caballos XX con inversión sexual también exhiben una apariencia masculina pero fenotipos variables tales como testículos sin espermatozoides, clítoris agrandado o pene pequeño, algunos con tejido ovárico y otros órganos femeninos internos o externos. La mayoría de estos caballos producen altos niveles de testosterona y exhiben un comportamiento similar al semental. Todos eran SRY-negativos. Un caso descrito por Constant *et al.* (1994) fue una criptorquidea bilateral con un pene y un prepucio pequeños. El examen histológico de los testículos reveló túbulos seminíferos poco desarrollados sin espermatogonias. Se desconoce la causa de este síndrome en caballos, pero se sospecha de una mutación genética autosómica que se hereda como rasgo recesivo (Buoen *et al.*, 2000). Recientemente se ha descrito un caso XX de reversión sexual con deleción de una gran porción de la región eucromática Y (Bugno *et al.*, 2008).

Anaya *et al.* (2014) presentan 4 nuevos casos de sexo reverso en yeguas con complemento cromosómico 64 XY. SRY negativo. El cariotipo masculino se presentó en todas las metafases, estos resultados se confirmaron por hibridación fluorescente in situ (FISH). Además se realizó una caracterización molecular, dos genes diferentes ubicados en los cromosomas sexuales. El gen ZFX / Y se amplificó en todos los casos.

#### *Deleción autosómica*

Dado que las deleciones autosómicas, dependiendo de su tamaño y del cromosoma afectado, pueden tener efectos profundos en el desarrollo embrionario y la supervivencia, es lógico que sólo se hayan reportado algunos casos para los caballos. Halnan *et al.* (1982) informaron de un semental estéril de Standardbred con espermatozoides anormales que exhiben mala motilidad y un cariotipo de 64, XY, del (13) (qter). McFeely *et al.* (1989) presentaron el caso de un semental árabe, su media hermana fraterna y medio hermano con deleciones del cromosoma 10 en forma de mosaico (64, XY / 63, XY, -10, 64, XX / 63, XX, -10 y 64, XY / 63, XY, -10, respectivamente). La anomalía cromosómica presente en este semental sólo se pudo identificar después de que se cruzó con yeguas normales que perdieron sus preñeces entre 2,5 y 5 meses de gestación.

#### *Trisomía autosómica*

Sólo siete casos de trisomía autosómica han sido reportados en el caballo y todos ellos involucraron cromosomas más pequeños dentro del cariotipo de caballo. La trisomía que implica cromosomas más grandes puede ser una causa de pérdida embrionaria temprana, aunque esto no se ha demostrado debido a la dificultad en la obtención de material adecuado para el estudio.

La primera trisomía equina reportada fue un potro de pura sangre que exhibía un comportamiento anormal (Power, 1987). El potro era pequeño en estatura y mostró criptorquidia con azoospermia. Tras el cariotipo se encontró que tenía trisomía 28. Bowling y Millon, (1990) reportaron el único caso de trisomía 26 en el caballo, se trataba de una yegua pura sangre con mala conformación, incluyendo deformidades en los miembros angulares y marcha rígida. Era más alta en el crup que en la cruz, desmesurada, letárgica, e intolerante tanto al dolor como a la restricción física. Sin embargo, tenía un tracto reproductivo normal y produjo descendencia normal. También se reportó una forma de mosaico de trisomía 30 en una yegua fenotípicamente normal y fértil que produjo tres crías normales y un potro muerto (Kubieñ y Tischner, 2002).

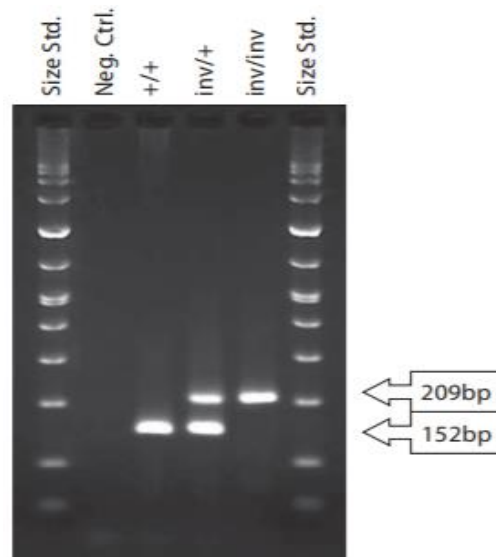
Bugno *et al.* (2007) describieron recientemente una trisomía mosaica 31 [64, XX / 65, XX, + 31] en una yegua pura sangre fenotípicamente normal. Sólo el 13% de sus metafases eran trisómicas, lo que podría explicar por qué era fenotípicamente normal. En el momento del cariotipo, tenía sólo 11 meses de edad, por lo que se desconoce si la trisomía podría afectar su fertilidad.

#### *Traslocaciones autosómicas*

Los informes de traslocaciones autosómicas en caballos también son raros. Estos caballos son fenotípicamente normales y sólo exhiben fertilidad reducida, por lo tanto las muestras no suelen ser enviadas para el examen cariotípico. El primer informe fue descrito por Power (1991) de una yegua púrpura fenotípicamente normal con una fertilidad reducida. Esta yegua había producido sólo dos potros en siete años de historia de cría. Su cariotipo reveló una translocación que implica ECA1q y ECA3q [64, XX, t (1q; 3q)]. Long (1996) informó de una segunda translocación en un semental de pura sangre con un fenotipo normal pero con una fertilidad reducida. Las yeguas con las que se apareo éste semental tenían una alta incidencia de pérdida embrionaria temprana. Este semental tenía un cariotipo de 63, XY, t (1; 30). Más recientemente, Lear y Layton, (2002) describieron una translocación en una yegua pura sangre subfétil con un fenotipo normal. Esta yegua había sido estéril durante tres años, pero más tarde produjo dos potros (en los años 2002 y 2004). Se encontró que tenía una translocación que implicaba a los cromosomas 1 y 16 [64, XX, t (1; 16)].

#### **Citogenética molecular**

La gran cantidad de variación genética aparente, como las duplicaciones segmentarias, deleciones e inversiones, requiere muchas veces de la utilización de herramientas de genómica molecular que identifiquen dichos reordenamientos del genoma. Un ejemplo de ello es el patrón de color del pelo del caballo tobiano, que parece ser una gran inversión cromosómica en el cromosoma 3 (Brooks *et al.*, 2007) (Figura 3). La inversión no tiene un efecto aparente sobre la salud. Sin embargo, se esperaría una modesta reducción en la fertilidad de los caballos que llevan la inversión basada en la producción de gametos no viables cuando la recombinación se produce dentro de la región invertida. La reducción de la fertilidad será directamente proporcional al tamaño de la inversión en este caso. Pero los criadores de caballos pueden no detectar las reducciones modestas de la fertilidad entre caballos, puesto que pueden centrarse en aspectos cualitativos de la producción más fácilmente identificables (Lear *et al.*, 2008).



**Figura 3.** Productos de la prueba de PCR para la inversión de ECA3. +/+ : homocigoto normal; inv/+ : heterocigótico para la inversión; inv/inv : homocigoto para la inversión.

### Consideraciones finales

En equinos, los datos bibliográficos indican que las aberraciones cromosómicas están generalmente ligadas a disfunciones sexuales y a cambios en la morfología reproductiva. En la República Argentina son escasos los trabajos sobre estos cambios cromosómicos; es por ello que en la actualidad estamos trabajando para producir información sobre las alteraciones cromosómicas presentes en los reproductores.

Hay que destacar que, como hemos mencionado anteriormente, en muchos casos sólo mediante un análisis citogenético es posible detectar estos cambios cromosómicos ya que los mismos no producen manifestaciones en el fenotipo de los animales. A pesar de ello, en los últimos años la citogenética clásica, para buscar ciertas explicaciones, comenzó a utilizar técnicas de genética molecular, como hemos citado en el caso de reversión de sexo XY; mientras que el cariotipo explica anomalías de las yeguas XY, no revela por qué estos caballos no se desarrollaron como machos a pesar de que tienen un cromosoma Y. Por lo que aquí interviene la genética molecular. Las yeguas XY estudiadas carecen de una gran zona (se ha eliminado) que incluye un gen llamado SRY, que es esencial en el desarrollo de los mamíferos machos (Lear, 2010).

Durante los últimos 60 años el estudio de los cromosomas con bandas ha sido el mejor método para identificar anomalías cromosómicas en caballos. En el futuro, al igual que con muchos diagnósticos, el cariotipo, el análisis cromosómico por Hibridación Fluorescente in situ (área poco desarrollada en equinos argentinos), junto con el análisis genómico proporcionarán información importante que permitirá a los profesionales y a los criadores de caballos tomar decisiones en las manada sobre la salud y la cría de los mismos.

**Bibliografía**

Anaya G, Moreno-Millan M, Bugno PM, Pawlina K, Membrillo A, Molina A, Demyda-Peyras S. 2014. Sex reversal syndrome in the horse: Four new cases of feminization in individuals carrying a 64, XY SRY negative chromosomal complement. *Anim Reprod Sci* 151: 22-27.

Arrighi FE, Hsu TC. 1971. Localization of heterochromatin in human chromosomes. *Cytogenetics* 10: 81-86.

Basrur PK, Kanagawa H, Gilman JPW. 1969. An equine intersex with unilateral gonadal agenesis. *Can J Comp Med* 33: 297-306.

Basrur PK, Kanagawa H, Podliachouk L. 1970. Further studies on the cell populations of an intersex horse. *Can J Comp Med* 34: 294-298.

Benirschke, PK, Brownhill LE, Beath MM. 1962. Somatic chromosomes of the horse, the donkey and their hybrids the mule and the hinny. *J Reprod Fertil* 4: 319-326.

Blue MG, Bruere AN, Dewes HF. 1978. The significance of the X0 syndrome in infertility of the mare. *N Z Vet J* 26: 137-141.

Bornstein S. 1967. The genetic sex of two intersexual horses and some notes on the karyotype of normal horses. *Acta Vet Scand* 8: 291-300.

Bouters R, Vandeplassche M, de Moor A: An intersex (male pseudohermaphrodite) horse with 64,XX/65,XXY mosaicism. *Equine Vet J* 4: 150-153 (1972).

Bowling AT, Millon L, Hughes JP. 1987. An update of chromosomal abnormalities in mares. *J Reprod Fertil Suppl* 35: 149-155.

Bowling AT, Millon LV. 1990. Two autosomal trisomies in the horse: 64,XX,-26,+(26q26q) and 65,XX,+30. *Genome* 33: 679-682.

Buoen LC, Zhang TQ, Weber AF, Ruth GR. 2000. SRY - negative, XX intersex horses: the need for pedigree studies to examine the mode of inheritance of the condition. *Equine Vet J* 32: 78-81.

Brooks S, Lear TL, Adelson D, Bailey E. 2007. A chromosome inversion near the *KIT* gene and the tobiano spotting pattern in horses. *Cytogenet Genome Res* 119: 225-230.

Bugno M, Słota E. 2007. Application of arm-specific painting probes of horse X chromosome for karyotype analysis in an infertile Hutsul mare with 64,XX/65,XX+Xp karyotype: case report. *Acta Vet Hung* 55 (3): 309-314.

Bugno M, Ząbek T, Golonka P, Pieńkowska-Schelling A, Schelling C, Słota E. 2008. A case of an intersex horse with 63,X/64,XX/65,XX,de Y karyotype. *Cytogenet Genome Res* 120: 123-126.

Caspersson T, Zech L, Johansson C. 1970. Differential banding of alkylating fluorochromes in human chromosomes. *Exp Cell Res* 60: 315-319.

Chandley AC, Fletcher J, Rossdale PD, Peace CK, Ricketts SW, et al. 1975. Chromosome abnormalities as a cause of infertility in mares. *J Reprod Fert Suppl* 23: 377-383.

Constant SB, Larsen RE, Asbury AC, Buoen LC, Mayo M. 1994. XX male syndrome in a cryptorchid stallion. *J Am Vet Med Assoc* 205: 83–85.

Dutrillaux B, Lejeune J. 1971. Sur une nouvelle technique d'analyse du caryotype humain. *C R Acad Sci Paris* 272: 2638–2640.

Gerneke WH, Coubrough RI. 1970. Intersexuality in the horse. *Onderstepoort J Vet Res* 37: 211–216.

Herzog A, Höhn H, Klug E, Hecht W. 1989. A sex chromosome mosaic in male pseudohermaphroditism in a horse. *Tierärztl Prax* 17: 171–175.

Halnan CRE, Watson JI, Pryde LC. 1982. Detection by Gand C-band karyotyping of gonosome anomalies in horses of different breeds. *J Reprod Fert Suppl* 32: 627–628.

Höhn H, Klug E, Rieck GW. 1980. A 63,XO/65,XYY mosaic in a case of questionable equine male pseudohermaphroditism *Proc 4 th European Colloq Cytogenet Domestic Animals*, pp 82–92.

Hughes JP, Bernirschke K, Kennedy PC. 1975. X0-gonadal dysgenesis in the mare (report of two cases). *Equine Vet J* 7: 109–112.

ISCNH. 1997. International system for cytogenetic nomenclature of the domestic horse, Bowling, A. T., Breen, M., Chowdhary, B. P., Hirota, K., Lear, T., et al (Committee). *Chromosome Res* 5: 433–443.

Kent MG, Shoffner RN, Buoen L, Weber AF. 1986. XY sex-reversal syndrome in the domestic horse. *Cytogenet Cell Genet* 42: 8–18.

Kieffer NM, Burns SJ, Judge NG. 1976. Male pseudohermaphroditism of the testicular feminizing type in a horse. *Equine Vet J* 8: 38–41.

Kubień E, Tischner M. 2002. Reproductive success of a mare 64,XX/65,XX,+30. *Equine Vet J* 34: 99–100.

Lear TL, Layton G. 2002. Use of Zoo-FISH to characterize a reciprocal translocation in a Thoroughbred mare: t(1; 16)(q16;q21.3). *Equine Vet J* 34: 207–209.

Lear TL, Lundquist JM, Zent WW, Fishback WDJr, Clark A. 2008. Three autosomal chromosome translocations associated with repeated early embryonic loss (REEL) in the domestic horse (*Equus caballus*). *Cytogenet Genome Res* 120:117–122.

Lear TL, Bailey E. 2008. Equine clinical cytogenetics: the past and future. *Cytogenet Genome Res* 120:42–49.

Long SE. 1996. Tandem 1; 30 translocation: a new structural abnormality in the horse (*Equus caballus*). *Cytogenet Cell Genet* 72: 162–163.

Mäkelä O, Gustavsson I, Hollmén T. 1994. A 64,X,i(Xq) karyotype in a Standardbred filly. *Equine Vet J* 26: 251–254.

Mäkinen A, Katila T, Andersson M, Gustavsson I. 2000. Two sterile stallions with XXY-syndrome. *Equine Vet J* 32: 358–360.

Makino S, Sofuni T, Sasaki MS. 1963. A revised study of the chromosomes of the horse, the ass and the mule. *Proc Jpn Acad* 39: 176–181.



McFeely RA, Klunder LR, Byars D. 1989. Equine infertility associated with autosomal mixoploidy. Proc 6 th N Am Colloq Domestic Animal Cytogenet, Purdue, p 7.

Paget S, Ducos A, Mignotte F, Raymond I, Pinton A. 2001. 63,XO/65,XYY mosaicism in a case of equine male pseudohermaphroditism. Vet Rec 148: 24–25.

Payne HW, Ellsworth K, DeGroot A. 1968. Aneuploidy in an infertile mare. J Am Vet Med Assoc 153: 1293–1299.

Power MM. 1987. Equine half sibs with an unbalanced X;15 translocation or trisomy 28. Cytogenet Cell Genet 45: 163–168.

Power MM. 1990. Chromosomes of the horse, in McFeely, R. A (ed). Advances in Veterinary Science and Comparative Medicine, Domestic Animal Cytogenetics. San Diego: Academic Press Inc. vol 34, pp 131–167.

Power MM. 1991. The first description of a balanced reciprocal translocation [t(1q;3q)] and its clinical effects in a mare. Equine Vet J 23: 146–149.

Rothfels KH, Alexrad AA, Siminovitch L, Mc- Culloch Parker RC. 1959. The origin of altered cell lines from mouse, monkey and man, as indicated by chromosome and transplantation studies. Proc Can Cancer Res Conf 3: 189–214.

Sumner AT. 1972. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. Exp Cell Res 75: 304-306.

Świtoński M, Chmurzynska A, Szczerbal I, Lipczynski A, Yang F, Nowicka-Posłuszna A. 2005. Sex reversal syndrome (64,XY;SRY-positive) in a mare demonstrating masculine behavior. J Anim Breed Genet 122: 60–63.

Trujillo JM, Stenius C, Christian LC. 1962. Chromosomes of the horse, donkey and the mule. Chromosoma 13: 243–248.