



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Dpto. de Ciencia Animal

Determinación genética de la epilepsia idiopática juvenil en
lince ibérico (*Lynx pardinus*)

Trabajo Fin de Máster

Máster Universitario en Mejora Genética Animal y Biotecnología de
la Reproducción

AUTOR/A: López de la Torre Fernández, Raúl

Tutor/a: Ibáñez Escriche, Noelia

Cotutor/a externo: FERNANDEZ MARTIN, JESUS

Director/a Experimental: GODOY LOPEZ, JOSE ANTONIO

CURSO ACADÉMICO: 2021/2022

MÁSTER INTERUNIVERSITARIO EN MEJORA
GENÉTICA ANIMAL Y BIOTECNOLOGÍA DE LA
REPRODUCCIÓN

**Determinación genética de la epilepsia idiopática
juvenil en lince ibérico (*Lynx pardinus*)**

Tesis de Máster

Valencia, septiembre 2022

Raúl López de la Torre Fernández

Directores

Dr. Jesús Fernández Martín

Dr. José Antonio Godoy López

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría expresar mi agradecimiento y reconocimiento a todas las personas que han contribuido en la realización de este Trabajo de Fin de Máster y que me han apoyado en este último año.

En primer lugar, a Jesús Fernández Martín, como tutor de este proyecto en el INIA-CSIC, que me ha acompañado, con mucha paciencia, y enseñado a trabajar en una investigación real fuera del ámbito académico. Y a José Antonio Godoy López, como tutor desde la Estación Biológica de Doñana (EBD-CSIC), por permitirme trabajar con él en el proyecto del lince ibérico.

A Elisabeth Morales, Silvia García-Ballesteros, Adrián López y Adrián López 2 (los “Adris”), Edgar Reinoso y María Muñoz por ser los mejores compañeros y por los momentos de descanso fuera y dentro del trabajo.

A Lucía Mayor por estar tan pendiente de mí y ofrecerse a ayudarme en todo momento.

A Beatriz Villanueva y María Saura por confiar en mí para un futuro proyecto y animarme a seguir dedicándome a la investigación.

A Noelia Ibáñez por sus consejos como directora de máster y amiga y al resto de profesores y compañeros del máster de mejora genética animal y biotecnología de la reproducción por todo el conocimiento que han compartido conmigo.

Por último, a mi familia, a mis amigos y a Raúl, por estar ahí en los momentos difíciles por los que he pasado este año.

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	3
INTRODUCCIÓN	5
1. El valor de la biodiversidad y la conservación	5
2. Programas de conservación	6
3. Genética de la conservación	8
4. Genética cuantitativa	11
5. Modelo de conservación: Lince ibérico	11
6. La epilepsia idiopática juvenil en el lince ibérico	14
OBJETIVOS	16
MATERIAL Y MÉTODOS	17
1. Datos de la población de lince ibérico	17
2. Datos genómicos obtenidos para el estudio	18
3. Variables	19
4. Análisis de datos	20
4.1. Análisis descriptivo de los datos.....	21
4.2. Estimación de los valores mejorantes	21
4.3. Otros análisis genéticos	22
RESULTADOS	27
1. Análisis descriptivo de los datos	27
2. Estimación de los valores mejorantes	30
3. Otros análisis genéticos	33
DISCUSIÓN	40
CONCLUSIONES	49
BIBLIOGRAFÍA	50

RESUMEN

Aunque el objetivo principal en la gestión de poblaciones en programas de conservación es mantener los niveles de diversidad genética lo más altos posible, las estrategias de manejo tienen que contemplar la posibilidad de realizar cierto grado de selección sobre defectos hereditarios que pueden aparecer. Así ocurre en el programa de cría en cautividad del lince ibérico (*Lynx pardinus*), donde se ha observado la aparición de casos de epilepsia idiopática juvenil que parecen tener un componente genético. Averiguar el tipo de determinación genética de esta enfermedad serviría para elaborar un protocolo de erradicación eficiente de la misma que no interfiriese con el objetivo principal del programa, ni pusiese en riesgo la viabilidad general de la especie. El objetivo del presente trabajo fue el estudio de la base genética de la epilepsia idiopática juvenil en el lince ibérico y determinar los factores que afectan a su manifestación en los animales. Para ello se utilizaron los datos que se han recolectado en el programa de cría en cautividad, incluyendo genealogías, registros fenotípicos de la incidencia de la enfermedad y otros factores, así como información molecular de ejemplares sanos y enfermos. En un primer análisis se comprobó que factores como el sexo, el lugar y el año de nacimiento no tenían efecto sobre el carácter. La edad de la madre mostró cierta incidencia (aunque tampoco significativa) siendo más probable la aparición de hijos epilépticos en madres jóvenes. El tipo de ancestría de los animales (origen Doñana o Sierra Morena) también mostró un efecto sobre la probabilidad de sufrir la epilepsia. El análisis usando un modelo umbral estimó altos niveles de heredabilidad y mostró una distribución de los valores mejorantes bimodal, lo que podría ser indicativo de la existencia de un gen con efecto grande que controlase la aparición de la enfermedad. Esta idea se vio reforzada por los resultados de un análisis de segregación, en el que el modelo más verosímil era el de la existencia de un gen con efecto grande con acción dominante, que se transmite de forma mendeliana, como causante principal de la enfermedad en el lince ibérico. La búsqueda de ese posible gen precisa del uso de información molecular. Actualmente, la cantidad disponible de datos moleculares no permitió tener potencia suficiente para obtener resultados concluyentes en un análisis de asociación, sobre todo teniendo en cuenta la estratificación de los datos. Las previsiones de un mayor número de genotipos con mayor densidad en un futuro cercano permitirán la realización de análisis de asociación, incluyendo variantes en genes candidatos identificados a partir de la anotación del genoma del lince ibérico.

Palabras clave: Lince ibérico, Cría en cautividad, Epilepsia, Análisis de segregación.

ABSTRACT

Although the main objective of the management of populations under conservation programs is to maintain levels of the genetic diversity as high as possible, the management strategies need to consider the possibility of performing a certain degree of selection on hereditary defects that may appear. This is the case of the captive breeding program of the Iberian lynx (*Lynx pardinus*), where the appearance of some cases of juvenile idiopathic epilepsy (which seems to have a genetic component) has been reported. Finding out the type of genetic determination of this disease would help to develop an effective eradication protocol that would not interfere with the main target of the program or compromise the general viability of the species. The objective of this work was to study the genetic basis of the juvenile idiopathic epilepsy in the Iberian lynx and to determine the factors that may affect its appearance in this population. To reach this goal, the data collected in the captive breeding program were used, including pedigree, phenotypic records of the incidence of the disease and other factors, as well as molecular information of healthy and diseased individuals. In the first analysis it was found that factors like sex, place and year of birth had no effect on the trait. The age of the mother showed a certain trend (although non-significant either), with the appearance of epileptic cubs being more likely in young mothers. The animal's type of ancestry (Doñana or Sierra Morena origin) also showed an effect on the probability of suffering the disease. The analysis using a threshold model estimated high levels of heritability and showed a bimodal distribution of the estimated breeding values, which may suggest the existence of a gene with a major effect that controls the appearance of the disease. This idea was reinforced by the results of a segregation analysis, in which the most likely model was that of the existence of a major gene with dominant action and Mendelian transmission, as the main cause of the epilepsy in the Iberian lynx. The search for this possible gene requires the use of molecular information. Currently, the amount of available molecular data and the high level of data stratification did not allow to obtain conclusive results in an association analysis. The larger number of lynxes genotyped at higher density, and including variants in candidate genes identified from the annotation of the Iberian lynx genome, that can be foreseen in the near future will allow more powerful association analyses.

Keywords: Iberian lynx, Captive breeding program, Epilepsy, Segregation analysis.

INTRODUCCIÓN

1. El valor de la biodiversidad y la conservación

De los 4 billones de especies que se estima que han ido evolucionando en nuestro planeta durante los últimos 3,5 billones de años, alrededor del 99% se han extinguido. Aunque las extinciones son algo común (Barnosky *et al.*, 2011), y aunque haya muchas definiciones para el concepto de “extinción masiva”, podemos decir con seguridad que nos encontramos inmersos en la sexta crisis de extinción masiva de la historia (Kleinman-Ruiz, 2020).

Estudios recientes muestran el impacto de la humanidad sobre el planeta (Pimm *et al.*, 2014). Uno de los problemas medioambientales más severos causados por el ser humano es el aumento de la pérdida de diversidad biológica. En los últimos 100 años se han extinguido casi 200 especies de vertebrados, número extremadamente alto (Ceballos *et al.*, 2020). La pérdida de tantísimas especies ha causado grandes cambios en los ecosistemas donde habitaban y eso, a su vez, está contribuyendo a la extinción de muchas otras especies. Este efecto se denomina “extinciones en cascada”, que están provocadas por la desaparición de una o varias especies clave en un ecosistema, como ocurrió con la vaca de mar de Steller (Estes *et al.*, 2015).

La población humana tiende a su crecimiento y esto conlleva un aumento en la tasa de consumo, que conduce a la progresiva pérdida de hábitats naturales, a la sobreexplotación de especies y, como ha quedado claro en los últimos años, a cambios globales en la distribución de especies y el clima. El problema viene cuando las especies no son capaces de adaptarse a estos cambios tan drásticos (MacDougall *et al.*, 2013). Las especies que estaban bien adaptadas a las condiciones ambientales anteriores disminuyen mucho su población, provocando una gran pérdida de variabilidad genética. Esto conduce a una mayor vulnerabilidad de estas poblaciones frente al cambio ambiental, provocando una limitación en las respuestas adaptativas. Esto se denomina vórtice de extinción (Figura 1) y puede provocar el fin de muchas especies (Blomqvist *et al.*, 2010).

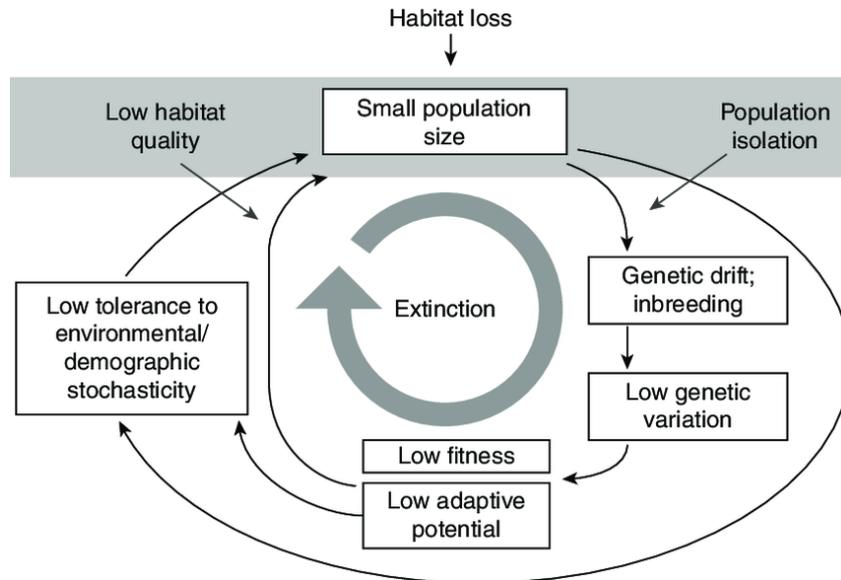


Figura 1. Representación de un vórtice de extinción, donde se explican los distintos factores que conducen hacia la extinción de las especies (tomado de Biere *et al.*, 2012).

Además, la biodiversidad es un factor clave para procesos como la polinización y dispersión de semillas, el control de plagas agrícolas, el control de enfermedades e, incluso, el acceso a agua potable y producción de comida. Cada una de estas acciones son indispensables para la regulación de la salud humana (Diaz *et al.*, 2006).

Por lo tanto, la pérdida de biodiversidad es un problema íntimamente ligado al ser humano, que debe ser capaz de paliar si quiere sobrevivir (Ceballos *et al.*, 2020). Para esto se deben aumentar los esfuerzos en la conservación de las especies (Delgado Bermejo *et al.*, 2019).

2. Programas de conservación

La conservación de la biodiversidad tiene como objetivo el mantenimiento de la las especies, sus hábitats y las relaciones entre los diferentes elementos de los ecosistemas. Es necesario definir y entender los procesos que están envueltos en la conservación de la biodiversidad para poder implementar las mejores estrategias de conservación (Mestanza-Ramón *et al.*, 2020). Según el estudio de Hoffmann *et al.* (2010), las acciones de conservación tienen un efecto positivo sobre la diversidad. Es más, hay múltiples estudios que demuestran el papel fundamental que han tenido los programas de conservación para el mantenimiento de muchas especies de vertebrados, como el cóndor de California (*Gymnogyps californianus*), el órix de Arabia (*Oryx leucoryx*), la grulla blanca (*Grus americana*) y el hurón de patas negras (*Mustela nigripes*).

Las poblaciones de especies salvajes experimentan un decrecimiento principalmente causado por la degradación y fragmentación de su hábitat, sobre todo debido a la expansión y crecimiento de actividades humanas como la agricultura. Para poder diseñar estrategias apropiadas de manejo y conservación, primero es necesario el estudio de las poblaciones amenazadas junto con estudios ecológicos de sus interrelaciones con el hábitat: características de las especies, las variaciones a nivel individual y poblacional y las respuestas ante diferentes factores ambientales (Navarro *et al.*, 2019).

Las estrategias de conservación pueden clasificarse en dos grandes grupos: las estrategias *in situ* y las estrategias *ex situ*.

- Las **estrategias *in situ*** consisten en la actuación manteniendo la población en el propio hábitat natural de la especie. Como la destrucción de hábitats naturales es la mayor amenaza que sufren las especies, las áreas protegidas son esenciales para conseguir reducir este impacto (Pimm *et al.*, 2014). La creación de reservas naturales es una herramienta idónea para proteger y monitorizar a las especies, aunque este tipo de estrategias proporcionan mejores resultados a largo plazo (Mestanza-Ramón *et al.*, 2020).
- Las **estrategias *ex situ*** son un conjunto de técnicas que se aplican fuera del hábitat natural de las especies diana, cuando la situación *in situ* es muy precaria, enfocándose principalmente en la cría en cautividad. Además del mantenimiento de ejemplares de estas especies en jardines botánicos o zoológicos, una técnica que puede ser muy útil es la crioconservación de semillas, óvulos o semen en bancos de germoplasma. Para muchas especies amenazadas, como el cóndor californiano, o especies extintas en su hábitat natural como el guacamayo de Spix (*Cyanopsitta spixii*), su única defensa contra la extinción es la implantación minuciosa de estas estrategias de conservación *ex situ* (Farhadinia *et al.*, 2020). Por lo tanto, las estrategias de conservación *ex situ* están más indicadas cuando la amenaza para las poblaciones es crítica a corto plazo, aunque se deberían considerar estas actuaciones como medidas transitorias e, idealmente, conducentes a la reintroducción de las especies en su hábitat natural una vez que las condiciones lo permitan.

En el artículo 9 de la convención de diversidad biológica (CBD) se reconoce el valor de los programas *ex situ* como herramienta suplementaria de los programas *in situ*

(Mestanza-Ramón *et al.*, 2020), ya que la estrategia de proteger zonas de hábitats naturales, aunque ideal, es insuficiente debido a la creciente población humana (Comizzoli, 2017). Los individuos en poblaciones cautivas están protegidos de amenazas como la depredación, están bajo supervisión continua y tienen acceso a asistencia sanitaria constante, lo que incrementa su supervivencia. Además, permiten llevar a cabo estudios más exhaustivos sobre la biología de las especies incluyendo su comportamiento, reproducción y fisiología (McGowan *et al.*, 2017). No obstante, el mayor impacto de los programas de conservación *ex situ* es el de proveer individuos para su reintroducción en poblaciones salvajes (Kleinman-Ruiz *et al.*, 2019).

Como queda patente, se han observado múltiples ventajas proporcionadas por este tipo de estrategia, aunque no todas las consecuencias son favorables. El manejo en cautividad puede generar respuestas adversas en las poblaciones. Algunas especies pueden llegar a mostrar tasas de estrés elevadas o disfunciones que no permiten su correcta cría. Es especialmente relevante el riesgo de que los individuos se adapten a las condiciones en cautividad (diferentes a las que tendrían en su hábitat natural) haciendo que la reintroducción no sea posible (Navarro *et al.*, 2019). Además, los programas de conservación *ex situ* suelen empezarse a partir de un número reducido de individuos (no es posible muestrear una gran cantidad de poblaciones habitualmente muy comprometidas), por lo que se produce un efecto fundador que va a condicionar la efectividad de la población cautiva. Si los condicionantes logísticos y/o fisiológicos hacen que el tamaño pequeño de las poblaciones se mantenga a lo largo del programa, la pérdida de diversidad puede ser muy rápida aumentando el coeficiente de consanguinidad en las mismas (Van Coillie *et al.*, 2008). La consanguinidad y la pérdida de diversidad genética pueden disminuir la eficacia biológica de la población *ex situ*. Además, si estos individuos son liberados a la naturaleza pueden conseguir el efecto contrario al deseado, disminuyendo la variabilidad genética de la población *in situ* (Wang & Ryman, 2001).

3. Genética de la conservación

La genética de la conservación proporciona las herramientas necesarias para gestionar los factores genéticos que aumentan el riesgo de extinción de las especies, minimizando esta amenaza (Frankham *et al.*, 2002). Entre los factores más importantes a los que tiene que dar respuesta la genética de la conservación se encuentran:

- **Efectos deletéreos de la consanguinidad** sobre la reproducción y la supervivencia de las especies (depresión consanguínea). Las consecuencias de la consanguinidad son fundamentales, por lo que es importante determinar el tamaño mínimo efectivo de las poblaciones para evitar la depresión consanguínea y asegurar la supervivencia a corto plazo (Caballero *et al.*, 2017).
- **Pérdida de la diversidad genética**, que provoca una disminución en la capacidad de evolucionar de las especies como respuesta adaptativa ante cambios en el ambiente (Hofreiter & Barnes, 2010).
- **Acumulación de mutaciones deletéreas**, que provocan una reducción en la eficacia biológica de las poblaciones (LaBar & Adami, 2017). El conjunto de mutaciones deletéreas que porta un individuo es lo que se denomina lastre genético.

Todos estos efectos son más preocupantes en poblaciones con un tamaño reducido. Esto se debe a que, como se ha expuesto anteriormente, son más propensas a sufrir mayor consanguinidad y mayor pérdida de diversidad genética (Hedrick & García-Dorado, 2016). El cambio aleatorio en las frecuencias alélicas, proceso denominado “deriva genética”, provoca la pérdida de muchos alelos a lo largo de las generaciones, manifestación de la pérdida de variabilidad a la que se enfrentan las especies en peligro de extinción (LaBar & Adami, 2017).

La consanguinidad en las poblaciones se estudia a través del coeficiente de consanguinidad. El coeficiente de consanguinidad de un individuo describe la probabilidad de que los dos alelos de ese individuo sean idénticos por descendencia (Blasco, 2021). La disminución del rendimiento biológico debido a la consanguinidad se conoce como depresión consanguínea (Fuerst-Waltl & Fuerst, 2012). Este efecto es más fuerte en caracteres relacionados estrechamente con la eficacia biológica o “fitness”, como son la supervivencia y la fertilidad. La reducción en la eficacia biológica como consecuencia de una tasa de apareamiento elevada entre individuos emparentados, ha sido ampliamente descrita en diversos estudios con animales (Chu *et al.*, 2019; Todd *et al.*, 2018).

En el caso concreto de los felinos, la fertilidad es uno de los factores más estudiados en relación a la consanguinidad, ya que está estrechamente relacionada con la supervivencia de las poblaciones (Huffmeyer, 2021). En el estudio de la consanguinidad en el puma del

Sur de California, perteneciente a la especie *Puma concolor*, se detectó que uno de los signos de depresión consanguínea era la teratospermia, asociada a una disminución en la reproducción de la población (Huffmeyer *et al.*, 2022). En la población de pantera de Florida (*Puma concolor cougar*), subespecie aislada de la anterior, también se encontraron defectos en el esperma, asociados a la reducida variabilidad genética provocada por una fuerte disminución demográfica de la especie (Roelke *et al.*, 1993). Los mismos resultados se obtuvieron en el estudio de Ruiz-López *et al.* (2012) sobre el lince ibérico (*Lynx pardinus*), al encontrarse una correlación positiva entre el grado de consanguinidad y la proporción de semen anormal en los individuos de dicha población.

Por lo tanto, en poblaciones que podemos gestionar, minimizar la consanguinidad debe ser uno de los objetivos principales para reducir la depresión consanguínea, basándonos en la información genealógica (Mishra *et al.*, 2017) y, potencialmente, utilizando datos genómicos (Leberg & Firmin, 2008; Hedrick & García-Dorado, 2016). Es bien sabido que la correcta elección de reproductores y el diseño de sistemas de apareamiento específicos (por ejemplo, el apareamiento de mínimo parentesco) pueden ser efectivos en la reducción del incremento de consanguinidad (Hedrick & García-Dorado, 2016).

Siendo la depresión consanguínea consecuencia de la existencia de alelos deletéreos en la población, la purga genética es uno de los procesos que pueden ayudar a mitigar los efectos de la consanguinidad, ya que permite reducir la carga genética nociva. Es un proceso importante para la eliminación de mutaciones deletéreas que se acumulan en las poblaciones constantemente (Kleinman-Ruiz *et al.*, 2022). Pero, aunque purgar alelos deletéreos es una opción, se ha demostrado que este proceso es ineficiente en poblaciones pequeñas, como son las poblaciones en cautividad de las especies amenazadas (Akesson *et al.*, 2016). Además, puede conllevar un riesgo de extinción más elevado durante el proceso de purgación. De cualquier manera, los programas de conservación deben tener en cuenta la existencia de esta variabilidad detrimental y, en la medida de lo posible, actuar para eliminarla, porque su manifestación supone un riesgo para la supervivencia de la población.

Otra solución para el problema de la consanguinidad en poblaciones pequeñas es la introducción de variabilidad a través del rescate genético. La introducción de individuos de poblaciones externas puede resultar en una recuperación de la población. Esto se demostró en el estudio de Whiteley *et al.* (2015), donde se observó la reducción de la depresión consanguínea en una población de lobo gris (*Canis lupus*) en la península

escandinava tras llevar a cabo un rescate genético con individuos de poblaciones externas. No obstante, si la población donante es muy diferente a la receptora, se pueden producir problemas de depresión exogámica, lo que sería contraproducente para la conservación de las especies.

4. Genética cuantitativa

La genética cuantitativa estudia las relaciones genéticas y los datos fenotípicos de los individuos para hacer inferencias sobre la herencia y la dinámica evolutiva de estos caracteres sin el conocimiento explícito de los loci concretos involucrados (Wilson *et al.*, 2010). Por lo tanto, también permite estimar parámetros importantes como la heredabilidad de un carácter.

Una de las herramientas más utilizadas en la genética cuantitativa es el modelo mixto animal, que permite estimar valores genéticos aditivos de los animales evaluados (o valores mejorantes) usando sus registros y/o registros de sus parientes a través de la genealogía (Henderson, 1975; Belinsky & Kennedy, 1988). El uso del BLUP (Best Linear Unbiased Predictor) permite además integrar en el modelo la información de otros factores que pueden influir en la manifestación del carácter. Originalmente las relaciones entre individuos se determinaban a partir de la genealogía, pero también es posible incluir información genómica para estimar el valor mejorante de los individuos (Meuwissen *et al.* 2001; Macedo *et al.*, 2020). El single-step genomic BLUP (ssGBLUP) es un modelo que integra la información de la matriz de parentesco genealógico (A) con la matriz de parentesco genómico (G) en una matriz combinada (H) (Misztal *et al.*, 2013a). De esta forma, el ssGBLUP integra todos los datos fenotípicos, genealogía e información genómica disponible para estimar los valores mejorantes de individuos genotipados y no genotipados simultáneamente (Mancisidor *et al.*, 2021).

5. Modelo de conservación: Lince ibérico

El estudio que se presenta en este trabajo se centra en el lince ibérico (*Lynx pardinus*), especie paradigma de una especie al borde de la extinción, y sobre la que se han estudiado múltiples aspectos relevantes para su conservación. Estos incluyen los problemas acarreados por su reducido tamaño poblacional, el aumento de consanguinidad en dicha población y de las actuaciones que se están implementando y las que se pueden llevar a cabo para revertir o paliar esta situación (Ruiz-López *et al.*, 2012; Kleinman-Ruiz *et al.*, 2019; Mínguez *et al.*, 2021).

El lince ibérico (Figura 2) es una de las especies de felino más amenazada del mundo (Figueiredo *et al.*, 2021; Millán *et al.*, 2009), apareciendo a día de hoy en la lista roja del IUCN como Amenazada (EN) (Rodríguez & Calzada, 2015). Durante la segunda mitad del siglo XX, la población de lince experimentó un declive drástico, reduciendo su número a unos 100 individuos, llevando a la especie a la categoría de En peligro crítico (CR). En 2003 se estableció un programa de conservación *ex situ* de la especie con individuos de las dos poblaciones remanentes, aisladas y diferenciadas genéticamente, que tuvo mucho éxito inicialmente desde el punto de vista demográfico (Kleinman-Ruiz *et al.*, 2019).



Figura 2. Foto de un individuo de la especie *Lynx pardinus* (Vargas *et al.*, 2009).

Las dos poblaciones se encontraban en el sur de España, en la comunidad de Andalucía: una población más periférica, que se encuentra en el área protegida del Parque Nacional de Doñana, y una población central, que encontramos en la Sierra de Andújar en Sierra Morena. Las poblaciones se han mantenido separadas desde hace unas 40 generaciones (alrededor de 200 años) ya que hay una distancia de 240 kilómetros aproximadamente entre ellas y numerosas barreras que impiden el flujo de animales. En el año 2007 se inició un plan de traslocaciones (fundamentalmente envío de animales de Sierra Morena a Doñana, que estaba más amenazada) y posteriormente una serie de reintroducciones sistemáticas desde el programa de cría en cautividad (Casas-Marce *et al.*, 2017). Gracias a los programas de conservación realizados en esta especie, incluyendo cruzamientos en

cautividad, protección del hábitat y reintroducciones, la población se ha incrementado hasta llegar a más de 1300 individuos en 2021 (https://www.miteco.gob.es/es/biodiversidad/temas/inventarios-nacionales/censodelinceiberico2021_tcm30-541552.pdf; último acceso el 2 de agosto de 2022).

Ya se han llevado a cabo varios estudios en el lince ibérico, usando herramientas moleculares, para hacer análisis genéticos de la población, incluyendo patrones de parentesco, caracterización genética de las poblaciones fundadoras y evolución de la consanguinidad y diversidad genética a lo largo de los años en el programa de cría en cautividad (Kleinman-Ruiz *et al.*, 2019). Y se han hecho análisis comparativos del genoma del lince ibérico con el genoma del lince euroasiático, que son especies hermanas, para estudiar las dinámicas de mutaciones deletéreas en la carga genética de las poblaciones (Kleinman-Ruiz *et al.*, 2022). En su estudio, Kleinman-Ruiz *et al.* (2022), utilizó el genoma completo de 20 individuos de la población de lince ibérico secuenciado a través de placas de Illumina HiSeq2000 v3.

Se conoce muy poco sobre las enfermedades que afectan a esta especie en cautividad y en libertad, aunque si se ha visto que las poblaciones estudiadas presentan signos de consanguinidad y pérdida alélica (Jiménez *et al.*, 2008). El cuello de botella demográfico, que ha experimentado el lince, y la pérdida de diversidad asociada a éste han aumentado gravemente su vulnerabilidad (Millán *et al.*, 2009). La consanguinidad ha sido propuesta en varias ocasiones como causa de la pérdida de efectividad del sistema inmune del lince ibérico. Estos estudios comenzaron a raíz de la muerte de varios individuos de esta población debido a la tuberculosis bovina, que se piensa que adquirieron a través de carne infectada de ciervo (*Dama dama*) o de jabalí (*Sus scrofa*) (Peña *et al.*, 2006).

Además de la debilidad del sistema inmune, debido a la consanguinidad, la falta de exposición del lince a algunos virus patógenos podría hacer a esta especie aún más vulnerable a posibles brotes en el futuro (Roelke *et al.*, 2008). Un brote del virus de la leucemia felina (FeLV) ya provocó la muerte de 7 de los 11 individuos afectados. Geret *et al.* (2011) en su estudio asocia la susceptibilidad a estos patógenos con la diversidad genética tan pobre que presenta la población. Incluso se han comparado estudios donde muestran los devastadores resultados de la infección de un virus, como es el coronavirus felino (FCoV), en una población de guepardo (*Panthera genus*) y avisan de que la

población de lince ibérico tiene incluso menor variabilidad genética que el guepardo (Roelke *et al.*, 2008).

También, en el estudio de Mínguez *et al.* (2021) sobre la epilepsia idiopática juvenil en el lince ibérico, se expone la relación de esta enfermedad con la consanguinidad, dejando evidencias de que esta enfermedad pueda ser consecuencia de la depresión consanguínea.

6. La epilepsia idiopática juvenil en el lince ibérico

La epilepsia es una enfermedad cerebral compleja donde una actividad repentina y anormal en las redes neuronales provoca signos clínicos de convulsiones determinados por características motoras, autónomas y/o conductuales (Berendt *et al.*, 2015). Basados en esta definición, las convulsiones aparecidas en el lince ibérico han sido diagnosticadas como epilepsia idiopática (Martínez *et al.*, 2013). La epilepsia idiopática es un tipo de epilepsia que ocurre sin una enfermedad o lesión subyacente, y que se sospecha que tiene una base genética causal (Berendt *et al.*, 2015).

Los mecanismos subyacentes a la epilepsia animal son aún desconocidos, aunque en algunos ejemplos, como en algunos perros de pura raza, está claro que esta enfermedad es el resultado directo de un defecto genético y las convulsiones son el signo clínico central de la enfermedad (Jokinen *et al.*, 2007).

En el estudio de Mínguez *et al.* (2021) se describen todos los signos clínicos de la epilepsia juvenil en los individuos afectados de la población de lince ibérico, así como sus exámenes genéticos, el tratamiento al que se les ha sometido, la evolución de la enfermedad y los posibles pronósticos. En la población en cautividad de lince ibérico se han encontrado 20 casos de individuos con signos de epilepsia. La edad a la que comienzan las convulsiones fue entre los 2 y 6 meses para 19 de los 20 individuos y, como excepción, uno de ellos comenzó con las convulsiones a los 26 meses (Mínguez *et al.*, 2021). Uno de los cachorros, cuyo tratamiento tuvo un seguimiento muy exhaustivo (Figura 3), presentaba episodios repentinos de actividad motora y comportamiento anormal, que ocurrían de manera transitoria y de corta duración. Comenzó las convulsiones a los 2 meses de vida con una alta frecuencia, pero el tratamiento con medicamentos antiepilépticos provocó una disminución de los signos hasta su desaparición después de un mes. Este lince no ha vuelto a tener signos de epilepsia en más de 10 años (Mínguez *et al.*, 2019).

El estudio concluye que hay evidencias suficientes para sugerir que existe una base genética para la epilepsia idiopática juvenil en esta especie al observarse que los individuos afectados eran en promedio más endogámicos que los individuos no afectados; esta es otra evidencia de los problemas de depresión consanguínea en el lince ibérico. Esto es muy importante tenerlo en cuenta para el manejo de los programas de cría. En 2012, asumiendo la posible base genética de esta enfermedad, se empezó a evitar el uso de individuos epilépticos y el apareamiento entre individuos que ya habían tenido hijos epilépticos, sospechosos de ser portadores de la enfermedad (Mínguez *et al.*, 2021).



Figura 3. Foto realizada a un cachorro de lince ibérico (*Lynx pardinus*) durante un examen físico y neurológico (Mínguez *et al.*, 2019).

El conocimiento de la base genética de la epilepsia idiopática podría ayudar en el control de la misma de forma más precisa (Mínguez *et al.*, 2021). Por ejemplo, se podrían utilizar estos datos para la realización de nuevos modelos de selección y apareamiento, escogiendo a los individuos con escasa probabilidad de transmitir la enfermedad, intentando así erradicar la enfermedad sin producir una pérdida importante de la variabilidad genética (Schulte-Hostedde & Mastro Monaco, 2015).

OBJETIVOS

El objetivo principal de este Trabajo de Fin de Máster es investigar la base genética de la epilepsia idiopática juvenil en el lince ibérico. También se pretenden estudiar los factores que pueden influir en la manifestación de la enfermedad y, en base a estos resultados, proponer medidas de gestión para ayudar a mejorar el programa de conservación *ex situ*.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Datos de la población de lince ibérico

Todos los datos sobre los individuos de la población de lince ibérico que se utilizaron en este estudio fueron cedidos por el comité de cría en cautividad del lince ibérico, actualizados a fecha 3 de junio de 2021. Se contó con una genealogía con un total de 1191 individuos, entre los que se encontraban los individuos fundadores (61 lince capturados inicialmente en Doñana o Sierra Morena), ejemplares nacidos en el programa de cría en cautividad y, también, los nacidos en las zonas de reintroducción, pero que son hijos de los individuos con origen en el programa *ex situ*.

La epilepsia es un carácter dicotómico, es decir, que los individuos se registran como “afectados” o “no afectados”. Se definió un total de 20 individuos como “afectados por epilepsia idiopática juvenil” en base a su historia clínica. En un principio establecimos dos supuestos para clasificar a los individuos como “no afectados”. El primer supuesto sería clasificar como individuo “no afectado” a los individuos que sabemos con certeza, debido a su monitorización, que no han sufrido ningún signo de epilepsia. Por otro lado, el segundo supuesto implicaría clasificar como individuos “no afectados” a todos aquellos que hayan llegado a una edad adulta (aunque no se les haya podido monitorizar durante su etapa juvenil debido a su nacimiento y crianza en la naturaleza), al considerarse que los animales afectados no hubieran sobrevivido sin recibir ningún tipo de tratamiento. Al final se decidió que el primer supuesto era el más adecuado para obtener una mayor fiabilidad en los resultados. Por tanto, los fundadores se consideraron individuos sin fenotipo, usándose sólo para determinar las relaciones genealógicas.

También se realizó una criba sobre los datos, eliminando del estudio a los individuos que no aportaban ningún tipo de información relevante para la investigación. Así pues, se decidió quitar a los individuos que habían muerto antes de los 2 meses, ya que no hay evidencias de que la enfermedad se manifieste antes de esa edad (Mínguez *et al.*, 2021) y, también, se eliminaron todos los registros de individuos nacidos en sitios de reintroducción, ya que estos individuos no han sido sometidos a una vigilancia adecuada y no se puede saber con certeza su condición de afectado/no afectado por la epilepsia. Tras esta criba, el número total de individuos en la genealogía se redujo a 553 registros,

de los cuales 492 contaban con fenotipos (“afectado” o “no afectado”) y 61 se incluyeron como individuos fundadores.

2. Datos genómicos obtenidos para el estudio

Los datos genómicos con los que cuenta este estudio fueron cedidos por la Estación Biológica de Doñana – CSIC. La selección de marcadores genómicos se llevó a cabo tras una búsqueda bibliográfica de genes candidatos asociados a la enfermedad de la epilepsia en humanos y otras especies domésticas. Inicialmente se seleccionaron 195 genes usando la base de datos de Ensembl (Cunningham *et al.*, 2022), de los que 143 pudieron ser localizados en el genoma de referencia del lince ibérico (Abascal *et al.*, 2016). Finalmente, se escogieron 93 de estos genes, con variantes en regiones codificantes o reguladoras.

La necesidad de seleccionar únicamente 96 SNPs para el genotipado condujo a hacer una selección de las variantes polimórficas encontradas en estos 93 genes. Las variantes se anotaron en el programa SnpEff v4.3i (Cingolani *et al.*, 2012) y se eligió la variante con mayor impacto de cada uno de estos genes (usando un criterio de “alto”, “moderado” y “bajo impacto” dependiendo de la localización de la variante dentro de cada gen y, en el caso de las variantes en regiones codificantes, si éstas eran sinónimas o no sinónimas). Para completar la placa de 96 SNPs se escogieron diferentes variantes de algunos de los genes, siempre que se encontrasen a una distancia suficiente para evitar en la medida de lo posible el desequilibrio de ligamiento entre marcadores.

Se utilizó una placa de Fluidigm 96x96 para genotipar los 96 SNPs candidatos usando el sistema BioMark™ (Fluidigm Corp., San Francisco, CA, E.E.U.U.). El software Cervus v3.0 (Kalinowski *et al.*, 2010) se usó junto con la genealogía conocida, para detectar inconsistencias mendelianas. En el proceso se eliminaron también los SNPs que habían resultado monomórficos en el conjunto de individuos genotipados (Figura 4).

Finalmente, el estudio pudo contar con un total de 59 marcadores moleculares, pertenecientes al grupo de SNPs candidatos, que fueron genotipados en 85 individuos de la población cautiva de lince ibérico, incluyendo a los 20 individuos detectados como epilépticos.

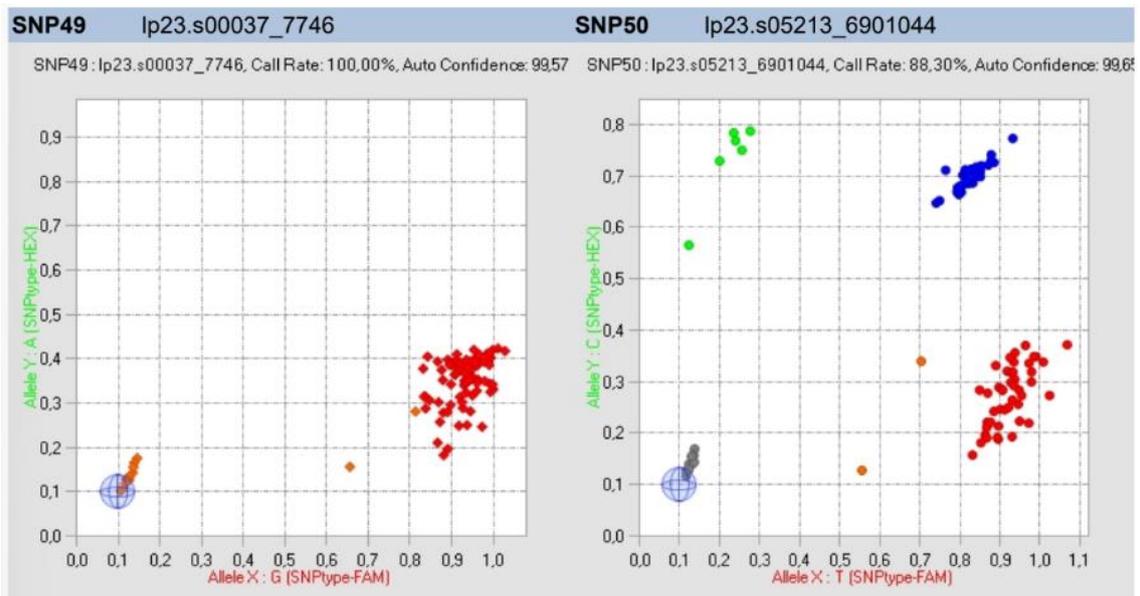


Figura 4. En esta figura se observan los resultados del genotipado obtenido para 2 de las variantes polimórficas (SNP candidato 49 y SNP candidato 50). En la gráfica de la izquierda se observa un SNP monomórfico en la población genotipada y en la gráfica de la derecha se observa un SNP que presenta resultados para genotipos homocigóticos (YY: Verde y XX: Rojo) y genotipos heterocigóticos (XY: Azul).

3. Variables

Para el análisis genético de la epilepsia idiopática, se utilizaron 5 factores principales, que podrían tener una influencia relevante sobre la aparición del carácter de interés.

Estos fueron:

- **Sexo.** Es un carácter con 2 niveles: macho o hembra.
- **Lugar de nacimiento.** Correspondiente a las 5 localizaciones de los diferentes centros de cría en cautividad del lince ibérico:
 - o **Acebuche.** Se encuentra en el Parque Nacional de Doñana, en Huelva.
 - o **Olivilla.** Centro ubicado en los montes de La Aliseda, en Jaén.
 - o **Silves.** Centro nacional de reproducción del lince ibérico de Portugal.
 - o **Granadilla.** Ubicado en Zarza de Granadilla, en Cáceres.
 - o **Jerez.** El Zoobotánico de Jerez.
- **Año de nacimiento.** Carácter con 17 niveles, cada uno corresponde al año de nacimiento del individuo (desde el 2005 al 2021).
- **Edad de la madre.** Es la edad que tenía la madre cuando dio a luz al individuo registrado. Este carácter tiene 14 niveles (desde los 2 a los 15 años).

- **Experiencia de la madre.** Es el número de camadas que ha tenido la madre hasta el nacimiento del individuo. Se representa en 9 niveles (desde el primer parto, o primerizas, hasta madres con 9 camadas).

Además de los factores antes reseñados se definieron dos variables con el objetivo de caracterizar el fondo genético de cada uno de los individuos:

- **ThetaS.** Es el porcentaje de ancestría de Sierra Morena del genoma de un individuo. Esta variable es cuantitativa, corregida entre valores de -1 y 1, donde el -1 corresponde a que el individuo es 100% de Doñana y el 1 corresponde a 100% de Sierra Morena.
- **ThetaH.** Es el grado de hibridicidad del individuo. Es una variable cuantitativa, también corregida entre valores de -1 y 1, donde el -1 corresponde a los individuos con alelos de un mismo origen para todos los loci (Sierra Morena o Doñana) y 1 corresponde a los individuos que son completamente heterocigotos, con un alelo de cada población, en todos sus loci (F1, descendientes de cruces entre los individuos de poblaciones diferentes).

Los dos últimos elementos (“ThetaS” y “ThetaH”) se utilizaron como covariables explicativas que consideran implícitamente la consanguinidad de los individuos. ThetaS permite ver la susceptibilidad de cada origen a la aparición de la enfermedad y ThetaH permite observar la existencia de heterosis al cruzar las poblaciones. Ambos factores se estimaron a través de un software propio creado en Fortran 90/95, obteniendo los diferentes valores por probabilidad basándose en la genealogía.

4. Análisis de datos

En el presente estudio se realizaron múltiples análisis para hacer una aproximación de la determinación genética de la epilepsia idiopática juvenil en el lince ibérico. Estos análisis se pueden separar en tres grandes bloques:

- El análisis descriptivo de los datos, donde se utilizaron distintos programas estadísticos para observar si alguno de los factores afecta de forma relevante a la aparición de la epilepsia.
- La estimación de los valores mejorantes a través del modelo mixto animal utilizando datos de la genealogía de los individuos (BLUP) y datos genómicos (single-step GBLUP).

- Una serie de análisis genéticos, donde se incluyen el análisis de segregación, el análisis de ligamiento utilizando los valores de IBDs y el test de desequilibrio de transmisión (TDT).

4.1. Análisis descriptivo de los datos

El análisis descriptivo de cada una de las variables, de forma independiente, permitió evaluar su influencia sobre el carácter de interés, que es la epilepsia (variable dependiente). Para dicho análisis se utilizaron distintos programas estadísticos como el software IBM SPSS Statistics v28.0 (IBM Corp., 2021) y diferentes paquetes estadísticos en R v4.1.1 (R Core Team, 2022).

Primero se trató la base de datos con el programa Microsoft Excel (2019) y se exportó al programa SPSS para la realización de test descriptivos, test chi-cuadrado y regresiones logísticas binarias. Los análisis descriptivos se llevaron a cabo para las variables “Sexo”, “Lugar de nacimiento”, “Año de nacimiento”, “Edad de la madre” y “Experiencia de la madre” usando tablas de frecuencias. Después, se analizaron las tres primeras con tablas de contingencia (análisis chi-cuadrado) para ver la relación de cada una de estas variables independientes con la variable dependiente “Epilepsia”. Para los otros dos factores se utilizó la regresión logística binaria, ya que “Edad de la madre” y “Experiencia de la madre” son variables con niveles que tienen un orden explícito. Este análisis permite estimar la influencia de los diferentes factores sobre la expresión del carácter dicotómico (Afectado o No afectado) en función de los datos de cada variable.

Por último, se analizaron las variables continuas (“ThetaS” y “ThetaH”). Para estas variables también se realizó una regresión logística binaria.

Diferentes paquetes de R se utilizaron para la creación de gráficas para cada uno de estos factores, mostrando la relación de cada variable independiente con la variable “Epilepsia”.

4.2. Estimación de los valores mejorantes

Se estimaron los valores mejorantes de los 553 individuos usando el carácter dicotómico “Epilepsia” mediante un modelo umbral. La familia de software BLUPf90 (Misztal *et al.*, 2018) fueron creados con FORTRAN90/95 e incluye programas específicos para caracteres umbral. Primero, se utilizó el software Renumf90 v1.98, para el tratamiento inicial de los datos y recodificación de la genealogía. Después, se corrió el programa

Thrgibbs3f90, para la obtención de los valores mejorantes con el modelo “Threshold” (o modelo umbral). Se generaron un total de 100.000 datos en la cadena, con un burning de 1.000 muestreando cada 50. Y, por último, se utilizó el programa Postgibbsf90, que usa los resultados anteriores, para estimar, a través de la distribución posterior, otros parámetros como la heredabilidad.

El modelo mixto animal que utiliza los datos fenotípicos y la genealogía (BLUP) se realizó incluyendo las variables independientes seleccionadas como dos covariables (ThetaS y ThetaH) y cinco variables discretas con sus respectivos niveles. El modelo fue el siguiente:

$$Y = \beta X + uZ + Sb_1 + Hb_2 + e$$

Donde Y es el vector de valores observados, β es el vector de los efectos de los factores, u es el vector de los valores mejorantes, b_1 y b_2 los coeficientes de regresión asociados a las variables ThetaS y ThetaH, respectivamente, X es la matriz de incidencia de los efectos fijos conocidos, Z es la matriz de incidencia de los efectos aditivos, S el vector de los valores ThetaS de cada individuo, H el vector de ThetaH y e es el vector del error residual.

Además de estimar los valores mejorantes para cada individuo, se estimaron los efectos de los niveles y los coeficientes de regresión para las dos covariables. Estos valores se compararon con los resultados obtenidos de los análisis descriptivos de los mismos.

La evaluación que integra también los datos genómicos se realizó con la metodología de ssGBLUP (Misztal *et al.*, 2013b). Para ello, se utilizaron los mismos datos que en el BLUP y los datos genómicos de 85 individuos (incluyendo los genotipos de los 20 epilépticos). El modelo y el software utilizado fueron los mismos que para el BLUP. Para la creación de la matriz H se utilizaron los parámetros que por defecto tiene el programa.

4.3. Otros análisis genéticos

El programa informático S.A.G.E v6.4.2 (Análisis estadístico para epidemiología genética) está compuesto por una colección de programas compilados en C++, que permite la realización de una gran variedad de análisis genéticos (S.A.G.E., 2021). El análisis principal que se llevó a cabo es el análisis de segregación. También se llevaron a cabo estudios de ligamiento como el TDT o diversos análisis que utilizan los valores estimados de IBDs.

El análisis de segregación estima el modo de herencia más probable evaluando las evidencias a favor de la posible existencia de un gen de efecto mayor subyacente a un carácter (Ginsburg & Livshits, 1999). Este tipo de análisis integra la transmisión genética mendeliana, la frecuencia alélica y la penetrancia con los patrones de covarianza esperada en la herencia poligénica (Cargill *et al.*, 2004). De esta forma, se puede estimar la probabilidad del tipo de herencia de un carácter concreto, como la epilepsia idiopática juvenil en el linaje ibérico, sea provocado por la acción de un gen de efecto mayor (que siga o no las reglas de la herencia mendeliana) o por una acción poligénica (Axenovich *et al.*, 1999).

Para este último bloque la genealogía tuvo que ser modificada. El paquete de S.A.G.E que realiza el análisis de segregación (**SEGREG**) tiene varias limitaciones. La limitación más importante es el requerimiento de una estructura familiar sin “loops” o bucles (Cargill *et al.*, 2004). Los bucles en la genealogía se refieren a situaciones familiares en las que aparecen individuos con ancestros comunes, como por ejemplo en las que un individuo tiene descendencia con dos medios hermanos (Figura 5).

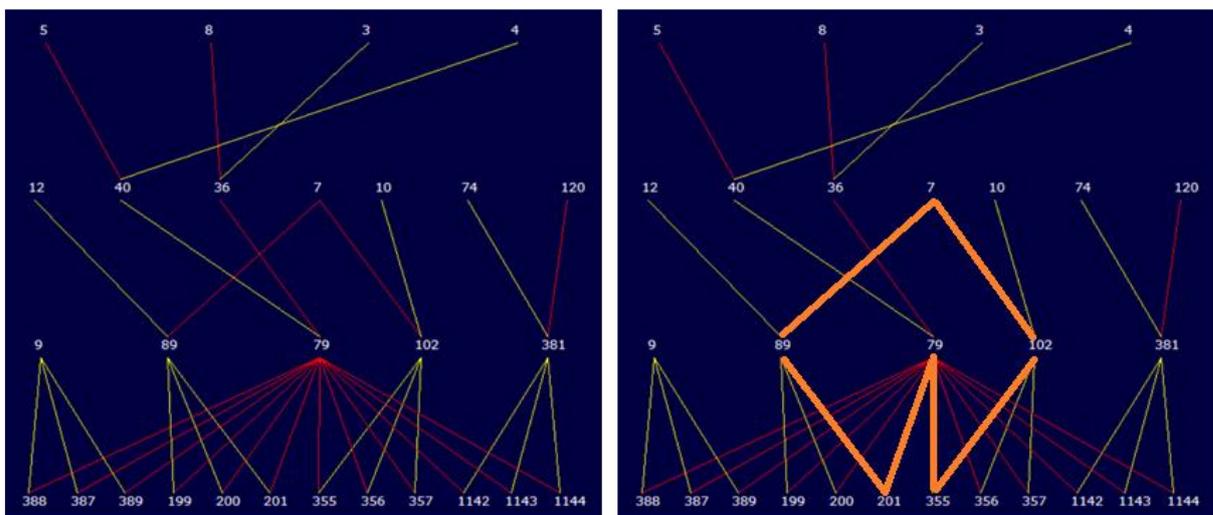


Figura 5. Ejemplo de un “loop” o bucle encontrado en la genealogía. Foto tomada con el programa Pedigree Viewer (obtenido a través del enlace <https://bkinghor.une.edu.au/pedigree.htm>).

Por lo tanto, se trató la genealogía de dos formas distintas:

- Partiendo la genealogía en distintas familias, evitando los bucles. Se crearon 8 pedigrís distintos a partir de los individuos afectados por la epilepsia. Un pedigrí

contenía a 13 de los individuos epilépticos y los otros 7 se repartieron en las otras 7 genealogías. De esta forma se evitó la presencia de bucles, aunque se redujo el número total de registros útiles a 250 individuos.

- Duplicando algunos individuos, usando un software informático específico (LOOP_EDGE), lo que evita la aparición de bucles. El software evita los bucles mediante 3 algoritmos distintos (0, edge y s), creando así 3 genealogías distintas (Axenovich *et al.*, 2008). No se tuvo que dividir los individuos en distintas genealogías, aunque 19 individuos quedaron “desconectados” de la genealogía principal, debido a la duplicación.

Por lo tanto, el análisis de segregación se repitió un total de 4 veces. El primero para la genealogía de 250 individuos y el resto fueron para 3 genealogías generadas por el software LOOP_EDGE. De esta forma, se pudo observar y comparar si, aunque la genealogía fuese un poco distinta, los resultados eran los mismos y, así, poder justificar la pérdida de información provocada por la eliminación de los bucles.

Solventadas las limitaciones del programa, se procedió al análisis de segregación utilizando 5 modelos distintos: modelo de no transmisión, modelo poligénico, modelo de transmisión mendeliana y, en caso de que fuese una transmisión mendeliana, modelo como A dominante y como A recesiva (B dominante).

- El modelo de no transmisión asume que no hay herencia entre los individuos.
- El modelo poligénico asume que el carácter viene dado por al menos 3 loci bialélicos con una frecuencia de 0,5.
- El modelo de transmisión mendeliana utilizado asume un locus bialélico (A y B) que genera tres genotipos (AA, AB y BB) y la distribución de estos se encuentra en Equilibrio Hardy-Weinberg. Estando el modelo A dominante restringido a $\beta_{AA} = \beta_{AB}$, mientras que el A recesivo está restringido a $\beta_{AB} = \beta_{BB}$, donde β equivale al efecto del genotipo correspondiente. Los parámetros de transmisión para los tres modelos estaban restringidos a valores esperados de $t_{AA} = 1$, $t_{AB} = 0,5$ y $t_{BB} = 0$, donde t es la frecuencia de transmisión, implicando que los homocigotos AA siempre transmiten el alelo A, los heterocigotos la mitad de las veces y los BB nunca (Cargill *et al.*, 2004).

El modelo con el AIC (Akaike's Information Criterion) más bajo se considera el más parsimonioso entre modelos igualmente probables (El-Gheriani *et al.*, 2003). Se compararon los resultados de los 5 modelos para las 4 genealogías creadas.

Para el resto de análisis que permitió realizar el programa S.A.G.E se utilizó únicamente la genealogía de 250 individuos, creado a través de la partición de familias en 8 pedigrís. Esto se debe a que el resto de paquetes del programa tenían una segunda limitación. Estos paquetes no permiten las genealogías que contienen "mating rings", es decir, no se permiten individuos con múltiples parejas, que a su vez estas parejas también tengan varias parejas.

Los paquetes que se utilizaron a continuación son: **MARKER INFO**, **FREQ**, **GENIB**, **SIBPAL** y **TDTEX**. Estos paquetes utilizan información de parentesco de la genealogía, fenotipos y los datos moleculares de los marcadores (SNPs) (S.A.G.E., 2021).

- **MARKER INFO**: este paquete permite detectar inconsistencias mendelianas en los resultados del genotipado, usando la genealogía, y crea un archivo limpio de inconsistencias.
- **FREQ**: Calcula las frecuencias de los alelos de cada marcador. Las frecuencias son estimadas por el método de máxima verosimilitud y compara dos modelos distintos. Uno en el que las frecuencias genotípicas se encuentran en Equilibrio Hardy-Weinberg y otro en el que estas frecuencias se ven afectadas por consanguinidad. El software detecta los marcadores que presentan resultados más verosímiles para el modelo que tiene en cuenta la consanguinidad. La presencia de consanguinidad provoca una disminución de los individuos heterocigotos y un aumento de los homocigotos (Tabla 1), por lo que las frecuencias genotípicas de la población se ven alteradas (Blasco, 2021).

	Equilibrio H-W	Con consanguinidad
Freq (AA)	p^2	$p^2 + pqF$
Freq (AB)	$2pq$	$2pq(1 - F)$
Freq (BB)	q^2	$q^2 + pqF$

Tabla 1. Diferencias en las fórmulas de las frecuencias genotípicas cuando la población se encuentra en equilibrio de Hardy-Weinberg y cuando no se encuentra en equilibrio (Coeficiente de consanguinidad = F) (Blasco, 2021).

- **GENIBD:** Este paquete estima la probabilidad de compartir alelos idénticos por descendencia (IBD: Identity by descent) entre hermanos completos y medios hermanos. Dos haplotipos son idénticos por descendencia si comparten los mismos alelos heredados de un ancestro común (Browning & Browning, 2012). GENIBD crea un fichero nuevo con estos valores estimados.
- **SIBPAL:** A partir de los datos estimados de IBDs se realizaron dos tipos de análisis de regresión con modelos distintos. El primero teniendo en cuenta únicamente el carácter de la epilepsia (Epilepsy ~ Intercept + Marker + e) y otro teniendo en cuenta los mismos factores que se usaron para la evaluación genética de forma individual (Epilepsy ~ Intercept + Marker + Factor + e). De esta forma, se analizó qué marcadores tenían un efecto significativo sobre la epilepsia y que variables mostraban mayor efecto.
- **TDTEX:** Este paquete realiza un test TDT (Transmission desequilibrium test). El test TDT hace una asociación basada en la genealogía entre un marcador genético y un carácter concreto (epilepsia) (Clayton, 1999). Se asume que la transmisión de los alelos es mendeliana y que el exceso de un alelo concreto en la descendencia afectada indica un locus ligado a un gen de susceptibilidad a la enfermedad y, por lo tanto, sometido a selección (He *et al.*, 2014).

RESULTADOS

1. Análisis descriptivo de los datos

A continuación, se exponen los resultados obtenidos respecto a la influencia de los distintos factores sobre el carácter “Epilepsia”. Comenzando con el análisis de las variables discretas “Sexo”, “Lugar de nacimiento” y “Año de nacimiento” (véase los resultados del análisis chi-cuadrado en la Tabla 2), se observó que los individuos epilépticos se encuentran distribuidos de forma igualada en todos los niveles en cuanto al sexo y lugar de nacimiento (ver la representación gráfica en las Figuras 6 y 7 respectivamente). En cambio, sí se vio una distribución diferenciada en el caso del año de nacimiento (Figura 8) con ausencia de individuos epilépticos en los últimos cuatro años incluidos en el estudio.

Variable explicativa	Valor de χ^2	Valor de p
Sexo	0.939	0.333
Lugar de nacimiento	2.017	0.733
Año de nacimiento	32.489	0.009*

Tabla 2. Resultados del análisis chi-cuadrado de las variables “Sexo”, “Lugar de nacimiento” y “Año de nacimiento”.

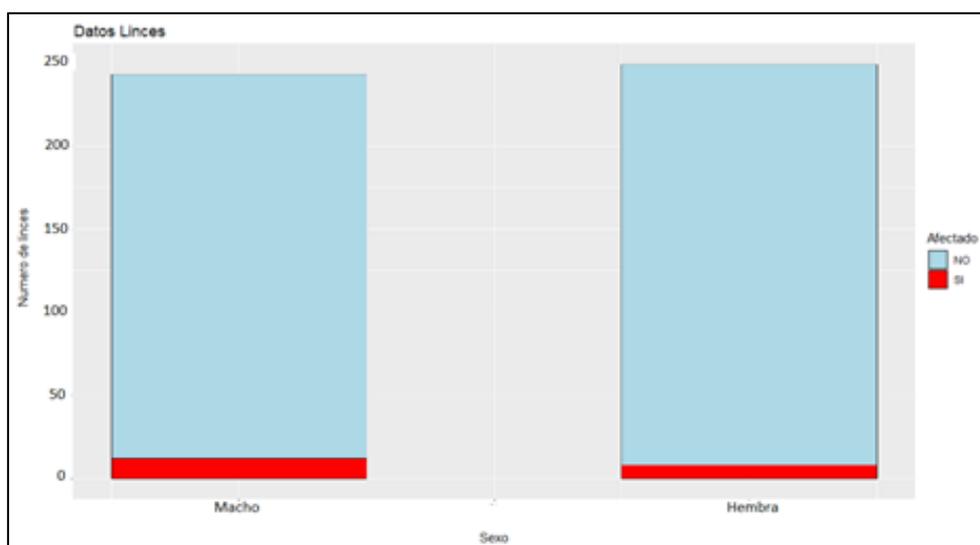


Figura 6. Gráfica comparativa de los individuos afectados y no afectados diferenciados en cuanto al sexo. Se indican en azul los individuos sanos y en rojo los individuos afectados por la epilepsia.

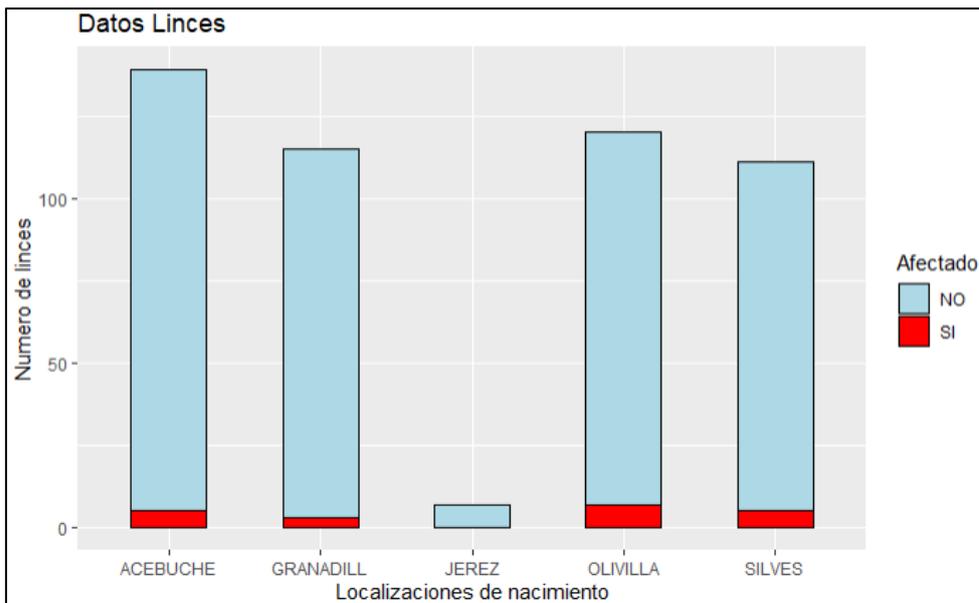


Figura 7. Gráfica comparativa de los individuos afectados y no afectados diferenciados en cuanto al lugar de nacimiento. Se indican en azul los individuos sanos y en rojo los individuos afectados por la epilepsia.

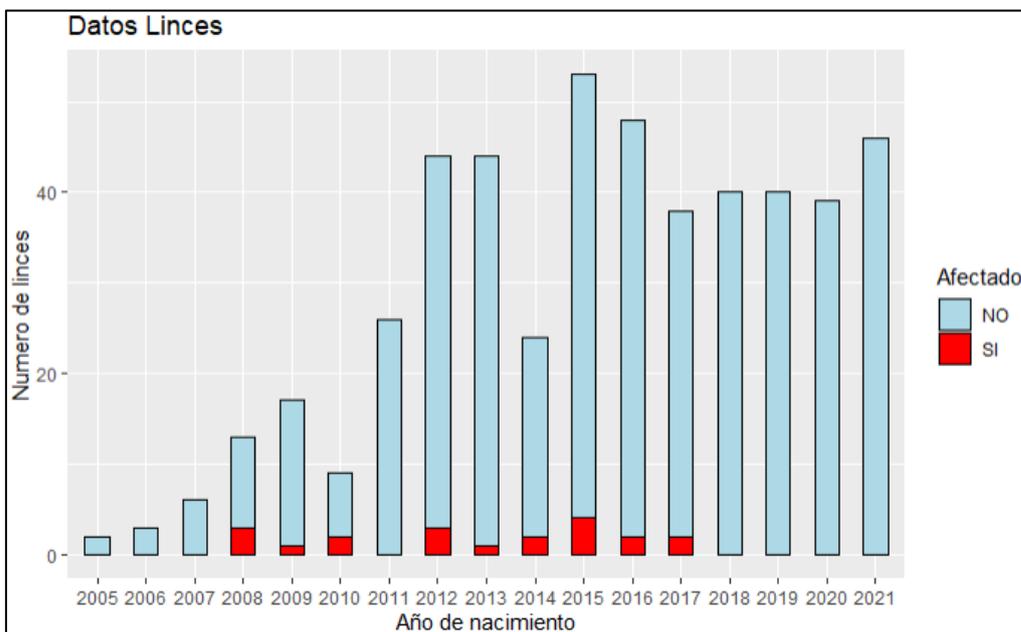


Figura 8. Gráfica comparativa de los individuos afectados y no afectados diferenciados en cuanto al año de nacimiento. Se indican en azul los individuos sanos y en rojo los individuos afectados por la epilepsia.

Los factores “Edad de la madre” y “Experiencia de la madre” se analizaron con la regresión logística binaria, pero ninguno mostró indicios significativos de su influencia sobre la variable “Epilepsia” (Edad de la madre: $W = 2,97$; p -valor = 0.085; Experiencia de la madre: $W = 0.56$; p -valor = 0.452). La edad de la madre dio un resultado cercano al valor de significación.

Los resultados de la regresión logística binaria realizada para las variables ThetaS y ThetaH fueron significativos (ThetaS; $W = 9.595$; p -valor = 0.002; ThetaH: $W = 7.683$; p -valor = 0.006). La variable “ThetaS” mostró una tendencia en la aparición de individuos epilépticos cuanto mayor es el porcentaje de ancestría de Sierra Morena en el genoma de los individuos (Figura 9). Y, a su vez, el análisis de la variable “ThetaH” mostró una relación inversa entre la hibridicidad y la afección por epilepsia; es decir, los individuos con una mayor proporción de loci con los dos alelos del mismo origen tienen una mayor probabilidad de incidencia de epilepsia (Figura 10).

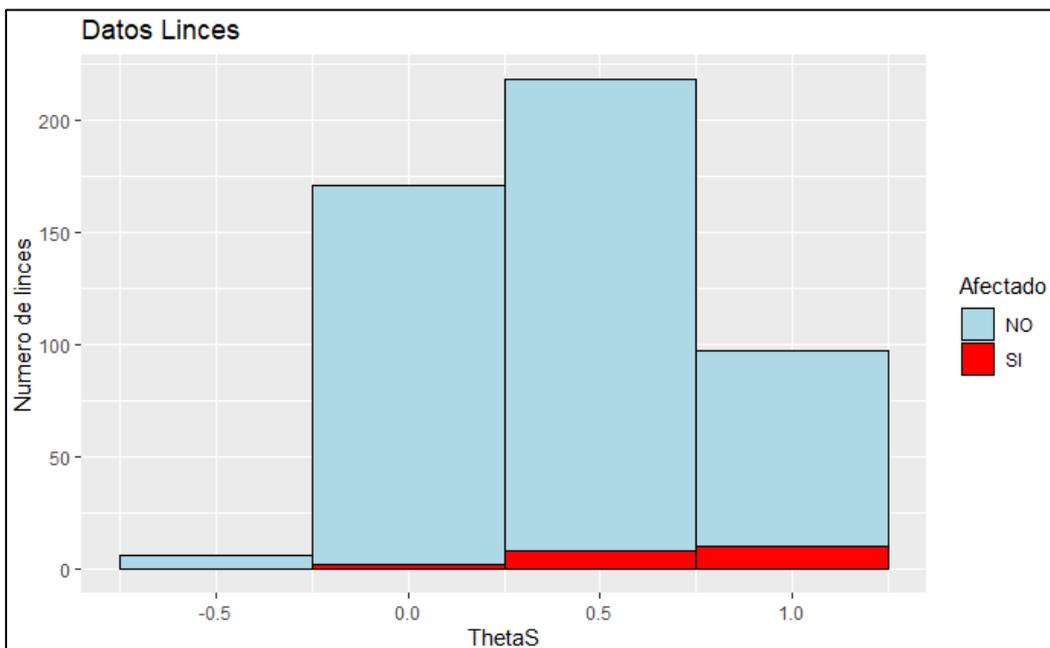


Figura 9. Gráfica que representa la tendencia de la aparición de la epilepsia en relación al porcentaje de ancestría de Sierra Morena en los individuos de la población de lince ibérico. Se marcan en rojo los individuos afectados por la epilepsia.

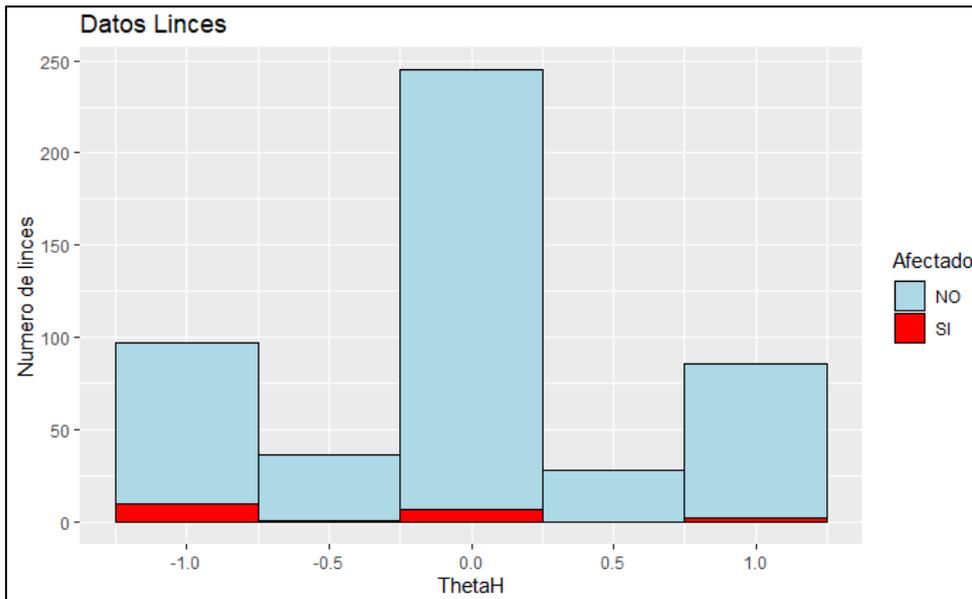


Figura 10. Gráfica que representa la tendencia de la aparición de la epilepsia en relación al porcentaje de hibrididad en los individuos de la población de lince ibérico. Se marca en rojo los individuos afectados por la epilepsia.

2. Estimación de los valores mejorantes

Los valores mejorantes en la escala subyacente, estimados a través del BLUP, mostraron una distribución bimodal (Figura 11), en vez de la distribución normal esperada para un carácter con herencia poligénica, presentando los 20 individuos epilépticos los valores más negativos. Es decir, los individuos epilépticos de la población de lince ibérico presentan los valores mejorantes más bajos.

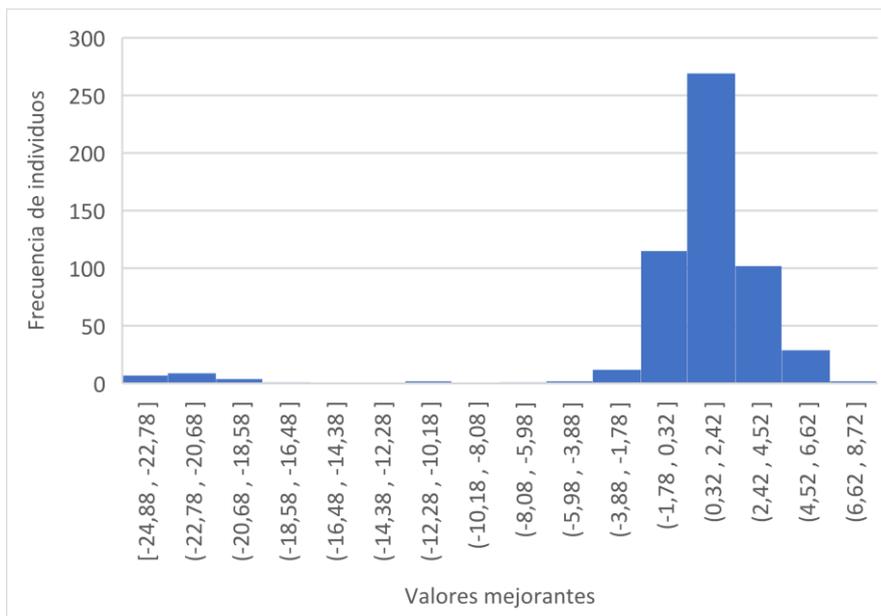


Figura 11. Distribución de los valores mejorantes obtenidos por BLUP usando el modelo umbral.

La heredabilidad (h^2) obtenida a través de este modelo umbral fue de 0.957 con un intervalo de confianza (95%) de [0.835, 1.079].

Los efectos estimados para los niveles de los diferentes factores que se han estudiado fueron no significativos en concordancia con los análisis previos que indicaban ausencia de incidencia de los mismos sobre la aparición de la epilepsia. La única excepción fue la covariable ThetaS, con una evidencia significativa de su efecto sobre la enfermedad (coeficiente de regresión estimado de -3.371 ± 2.796).

Es relevante destacar que, aunque los efectos estimados para la edad de la madre no son significativos, la media de los valores mejorantes agrupados por las clases determinadas por el factor “Edad de la madre” presentaron una tendencia positiva (Figura 12). Los hijos de madres más jóvenes, muestran unos valores mejorantes más negativos que las madres mayores y con más experiencia, es decir, una mayor prevalencia de la epilepsia.

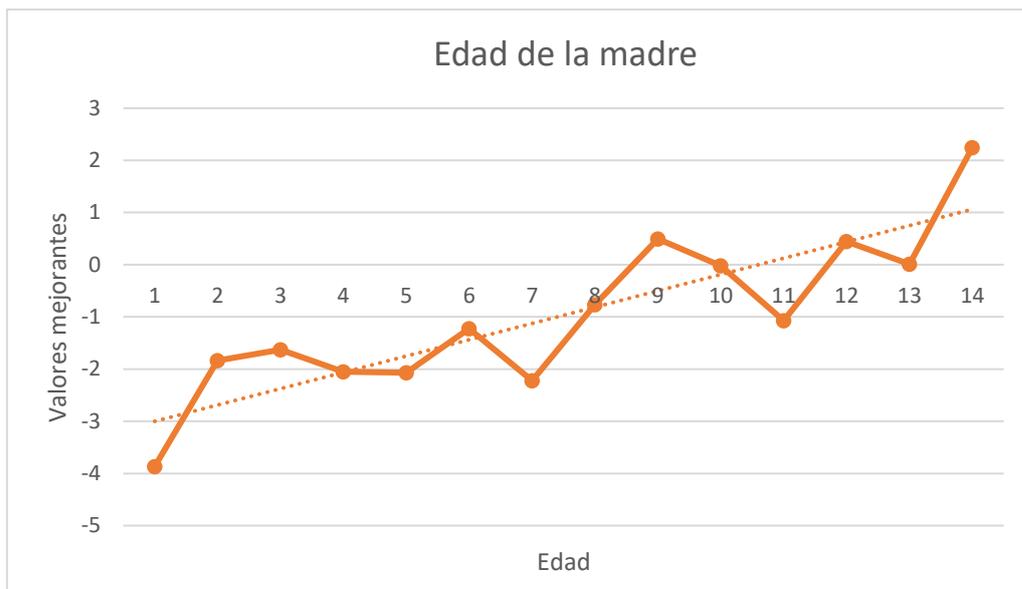


Figura 12. Gráfica que representa la tendencia de los valores mejorantes en función de la variable “Edad de la madre”, obtenidos a través del modelo umbral.

Los resultados del ssGBLUP muestran una distribución normal en las estimas de los valores mejorantes (Figura 13), en oposición a los resultados basados únicamente en la genealogía. La heredabilidad calculada del carácter de la epilepsia idiopática juvenil también fue muy diferente: 0.0428 con un intervalo de confianza (95%) de [0.0470, 0.113].

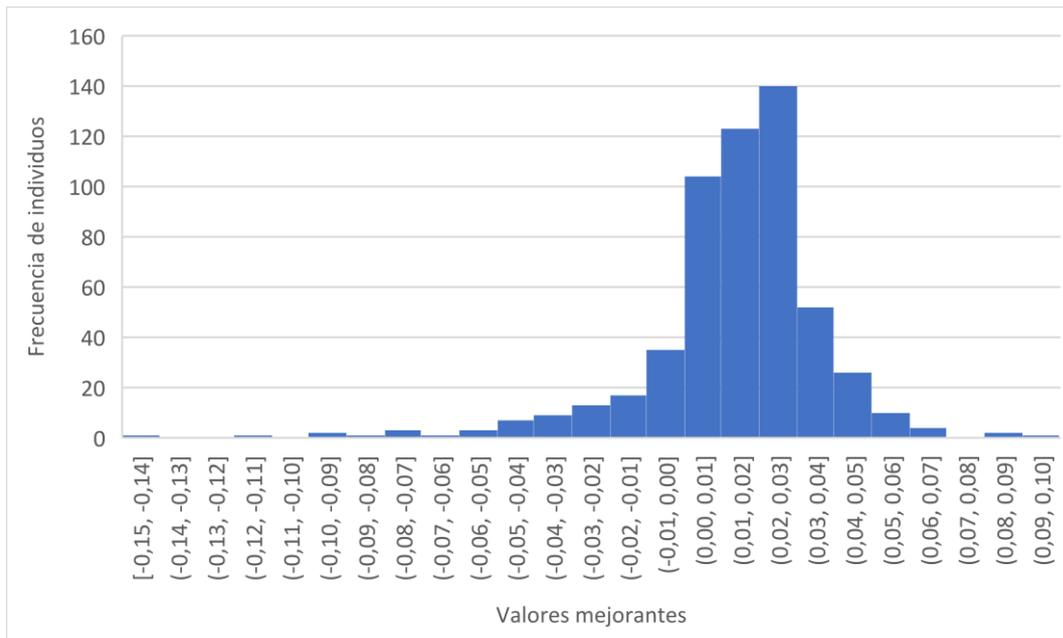


Figura 13. Distribución de los valores mejorantes obtenidos por el ssGBLUP usando el modelo umbral.

3. Otros análisis genéticos

Empezando con el análisis de segregación (paquete **SEGREG**), los resultados para las 4 genealogías creadas para solventar los bucles fueron parecidos, aunque con pequeñas discrepancias en las frecuencias estimadas de los alelos (Tablas 4, 5, 6 y 7). Todos ellos mostraron evidencias de que el resultado más parsimonioso, según el AIC, era el modelo de transmisión mendeliana de un gen con efecto mayor. Además, dentro del modelo de transmisión mendeliana, tres de las cuatro genealogías mostraron que el modelo más parsimonioso era el del alelo A dominante, por lo que se puede deducir que los heterocigotos y homocigotos dominantes presentan la misma condición (No afectado) y únicamente los individuos homocigotos recesivos se presentan como Afectados por la epilepsia. En la Tabla 6 se observan los resultados de la genealogía discrepante que estimó como igual de parsimonioso el modelo A dominante y el modelo A recesivo.

Genealogía del lince ibérico (partición)					
Modelo	No transmisión	Poligénico	Mendeliano	A dominante	A recesivo
freq_A	0,02140376		0,07574821	0,07574821	0,89936180
Prob_AA	0,00045812		0,00573779	0,00573779	0,80885164
Prob_AB	0,04189128		0,14002084	0,14002084	0,18102031
Prob_BB	0,95765060		0,85424137	0,85424137	0,01012805
LN	-68,3833	-69,3828	-68,1212	-68,1212	-68,1770
$\hat{-2LN}$	136,7670	138,7660	136,2420	136,2420	136,3540
AIC	144,7670	146,7660	144,2420	144,2420	144,3540
Pedigrís: 8		Individuos desconectados: 0		Nº de individuos totales: 250	

Tabla 4. Resultados del análisis de segregación realizado para los 5 modelos en la genealogía de 250 individuos, creada por la partición de la genealogía.

Genealogía del lince ibérico (duplicación 1)					
Modelo	No transmisión	Poligénico	Mendeliano	A dominante	A recesivo
freq_A	0,04380534		0,09219452	0,09219452	0,89730299
Prob_AA	0,00191891		0,00849983	0,00849983	0,80515265
Prob_AB	0,08377287		0,16738939	0,16738939	0,18430067
Prob_BB	0,91430822		0,82411078	0,82411078	0,01054668
LN	-89,6111	-87,9266	-85,3561	-85,3561	-85,4152
$\hat{-2LN}$	179,2220	175,8530	170,7120	170,7120	170,8300
AIC	187,2220	179,8530	178,7120	178,7120	178,8300
Pedigrís: 1		Individuos desconectados: 19		Nº de individuos totales: 672	

Tabla 5. Resultados del análisis de segregación realizado para los 5 modelos en la genealogía de 672 individuos, creada por la duplicación de varios individuos (Algoritmo 0).

Genealogía del lince ibérico (duplicación 2)					
Modelo	No transmisión	Poligénico	Mendeliano	A dominante	A recesivo
freq_A	0,03624219		0,08164982	0,08164982	0,91830843
Prob_AA	0,00131350		0,00666669	0,00666669	0,84329037
Prob_AB	0,06985739		0,14996625	0,14996625	0,15003612
Prob_BB	0,92882912		0,84336705	0,84336705	0,00667351
LN	-89,6144	-87,8307	-84,9830	-84,9830	-84,9830
χ^2 LN	179,2290	175,6610	169,9660	169,9660	169,9660
AIC	187,2290	179,6610	177,9660	177,9660	177,9660
Pedigrís: 1		Individuos desconectados: 19		Nº de individuos totales: 672	

Tabla 6. Resultados del análisis de segregación realizado para los 5 modelos en la genealogía de 672 individuos, creada por la duplicación de varios individuos (Algoritmo edge).

Genealogía del lince ibérico (duplicación 3)					
Modelo	No transmisión	Poligénico	Mendeliano	A dominante	A recesivo
freq_A	0,03512822		0,10492727	0,10492727	0,88788839
Prob_AA	0,00123399		0,01100973	0,01100973	0,78834579
Prob_AB	0,06778845		0,18783508	0,18783508	0,19908520
Prob_BB	0,93097756		0,80115518	0,80115518	0,01256901
LN	-89,6296	-89,1210	-86,3822	-86,3822	-86,4172
χ^2 LN	179,2590	178,2420	172,7640	172,7640	172,8340
AIC	187,2590	182,2420	180,7640	180,7640	180,8340
Pedigrís: 1		Individuos desconectados: 19		Nº de individuos totales: 672	

Tabla 7. Resultados del análisis de segregación realizado para los 5 modelos en la genealogía de 672 individuos, creada por la duplicación de varios individuos (Algoritmo s).

El resto de análisis, donde se incluyeron los datos genómicos sumados a los datos fenotípicos, ofrecieron información sobre los marcadores a tener en cuenta como marcadores candidatos.

El paquete **MARKER INFO** detectó las inconsistencias mendelianas en los datos (Figura 14) para los diferentes SNPs. Como resultado, proporcionó un archivo libre de inconsistencias, eliminando la información molecular de los individuos con inconsistencias y los de su familia. Este archivo depurado fue el que se utilizó en el resto de análisis.

Table 2 with Marker(s)						
			1193814	2205025	1201136	
Pedigree	Individual		1193814	2205025	1201136	
1	3	Mother	1/1	1/1		
1	65	Father	2/2	2/2		
1	245		[./.] [./.]	
1	244		[./.] [./.]	
1	243		2/2	1/1		
1	155		[1/2] [1/2]	
155	132	Mother	2/2			
155	155	Father	1/2			
155	338		[./.] [./.]	
155	337		1/1			
155	336		[2/2] [2/2]	
155	335		[./.] [./.]	
155	298		[./.] [./.]	
155	296		[2/2] [2/2]	
163	31	Mother	2/2		2/2	
163	120	Father	2/2		1/1	
163	163		1/2		2/2	
224	73	Mother		1/1		
224	103	Father		1/2		
224	224			2/2		
79	89	Mother			1/1	
79	79	Father			2/2	
79	201				[1/2]
79	200				[1/2]
79	199				1/1	

Figura 14. Ejemplo de los resultados obtenidos con el paquete **MARKER INFO**. En la figura se observan los marcadores 1193814, 2205025 y 1201136 y sus correspondientes inconsistencias dentro de las familias presentes en la genealogía correspondiente.

El paquete **FREQ** mostró evidencias significativas de que las frecuencias de 28 de los 59 marcadores en la población no se encuentran en equilibrio de Hardy-Weinberg y, por tanto, pueden estar afectadas por la consanguinidad (Figura 15).

```

=====
Allele frecuencias '1542373'
=====
-----
Allele  Founders only  Entire dataset  MLE (no inbreeding)  MLE (inbreeding = -0.384533)
-----
1         0.466216      0.522581      0.466216      0.466253
2         0.533784      0.477419      0.533784      0.533747
-----
MAXIMIZATION RESULTS 1542373
=====
-----
Parameter  Estimate  S.E.    Deriv
-----
Alleles
      1  0.466216  0.038100  -0.0000144000
      2  0.533784  0.038100  0.0000125849
-----
Final Log likelihood without inbreeding: -122.348954
=====
MAXIMIZATION RESULTS 1542373
=====
-----
Parameter      Estimate  S.E.    Deriv
-----
Alleles
      1  0.466253  0.012444  -0.0155473065
      2  0.533747  0.012444  -0.0045710025
Inbreeding coeff. -0.384533  0.018875  0.0039929885
-----
Final Log likelihood with inbreeding: -116.707577
=====
Test of Marker Specific Inbreeding Coefficient
=====
H0 Log likelihood without inbreeding 1542373 -122.348954
H1 Log likelihood with inbreeding 1542373 -116.707577
2 * |H0 - H1|                               11.282754
Degrees of freedom                               1
P-value                                           0.000782

```

Figura 15. Ejemplo de los resultados obtenidos por el paquete FREQ para uno de los marcadores estudiados. En la figura se observa el marcador 1542373, que presenta resultados significativos en el test de máxima verosimilitud.

Con el módulo **SIBPAL** se realizaron dos análisis de regresión. El primero, que solo tiene en cuenta el carácter de la epilepsia, mostró los marcadores con un efecto significativo en relación a la aparición de la enfermedad (Figura 16). Los marcadores con efecto significativo fueron el 794306, el 1351154, el 1621812 (siendo el pico más alto), el 1509467 y el 941955. Por otro lado, se realizó un segundo análisis teniendo en cuenta de manera individual todos los efectos que se han incluido en el estudio. Se observó que solo para las variables ThetaS y ThetaH la mayoría de marcadores presentaron señales significativas (Figura 17).

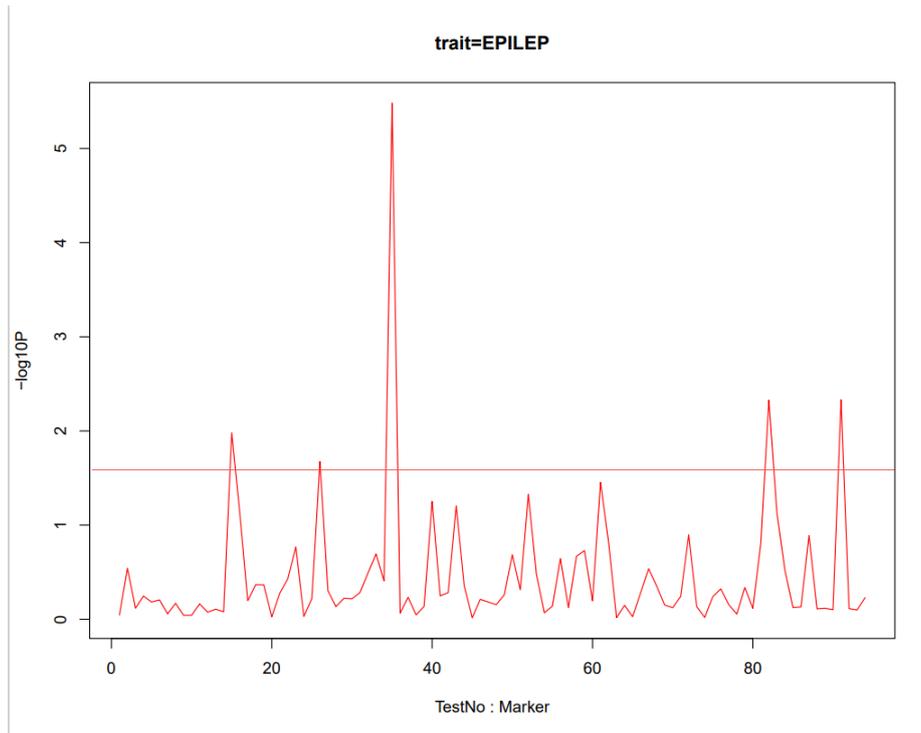


Figura 16. Resultados del análisis de regresión (Epilepsia \sim Intercept + MARKER + e), donde se observan los picos significativos de los 5 marcadores. El pico más alto pertenece al marcador 1621812.

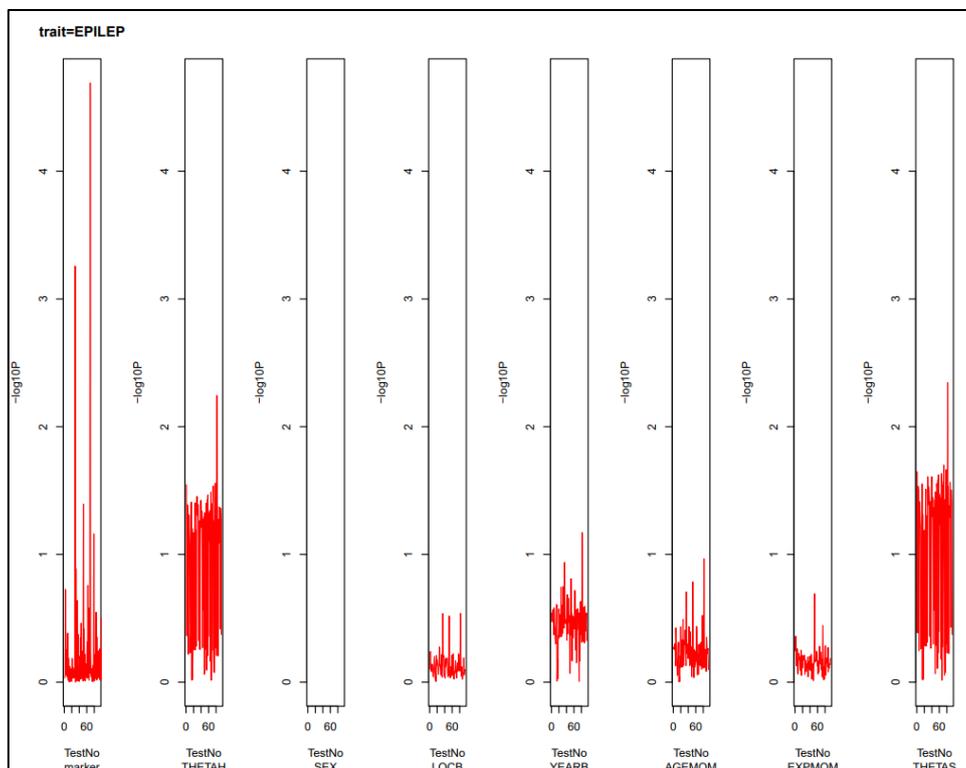


Figura 17. Resultados del análisis de regresión (Epilepsia \sim Intercept + MARKER + Covariate + e), donde se incluyen en el análisis los efectos individualmente.

Por último, el paquete **TDTEX**, que realiza el test TDT, mostró otros 3 marcadores con efecto significativo sobre la aparición de la epilepsia en la población de lince (Figura 18). Estos marcadores son el 1541373, el 1850990 y el 3639725.

```

=====
Transmission type:      Allele
Marker:                 1542373
Trait:                  EPILEP
Parental trait:         Not specified
Parental sex(es) scored: Paternal/maternal
Max. children/family:   1
Max. sib pairs/family:  0
-----
T/NT  1  2
-----
1      5  12
2      3   6
-----
Group          Informative count  Total count  % Informative
-----
Pedigrees          5              8  0.625000
Families          13             75  0.173333
Affected children  13             13  1.000000
Affected sib pairs  0              0  0.000000
Sample size       15             26  0.576923
-----
Exact test statistic          P-value  Std. err.
-----
Exact McNemar test          (skipped)
Monte Carlo McNemar test    (skipped)
Monte Carlo Marginal Homogeneity (skipped)
-----
Asymptotic test statistic          P-value
-----
McNemar test                0.02013675 *
Continuity corrected McNemar test 0.03886710 *
Marginal homogeneity test     0.02013675 *
=====

```

Figura 18. Ejemplo de los resultados obtenidos por el paquete TDTEX para uno de los marcadores estudiados. En la figura se observa el marcador 1542373, que presenta una asociación significativa con el carácter Epilepsia.

De los 59 SNPs seleccionados como candidatos, se han encontrado evidencias en 8 de ellos de su posible cercanía a un gen con efecto grande sobre la aparición de epilepsia idiopática juvenil en la especie *Lynx pardinus*.

DISCUSIÓN

En este estudio se analizaron los datos fenotípicos, genealógicos y genotípicos de la población del programa de cría en cautividad de lince ibérico (*Lynx pardinus*) con el fin de investigar la base genética de la epilepsia idiopática juvenil, que de momento ha afectado a 20 individuos de esta población (Mínguez *et al.*, 2021). Los análisis realizados acerca del efecto de los diferentes factores no genéticos considerados sobre la aparición de la enfermedad no mostraron, en general, resultados significativos. En cambio, el porcentaje de genoma de cada uno de las dos poblaciones originales y el grado de hibridicidad (que refleja de forma implícita la consanguinidad y la heterosis) sí que dieron señales significativas de su efecto. Estas observaciones se confirmaron con las estimas de los efectos que se obtuvieron en la evaluación genética mediante la metodología BLUP. En paralelo, el análisis de componentes de varianza permitió confirmar la sospecha de que la presencia de epilepsia en lince ibérico tiene un componente genético muy importante (altos valores de heredabilidad). El análisis de segregación realizado con estos datos (así como la distribución de los valores mejorantes) ayudó a esclarecer el modo de herencia de este carácter, soportando que la epilepsia idiopática juvenil en la población de lince ibérico tiene alta probabilidad de estar controlada por un gen de efecto mayor de transmisión mendeliana con el alelo deletéreo recesivo.

La aparición de enfermedades es un problema que puede comprometer el éxito de un programa de conservación. Es por ello que se deben adoptar medidas activas de erradicación que no comprometan los objetivos generales del programa (Laikre, 1999). Las actuaciones concretas deberán estar basadas en las características de la enfermedad para que sean efectivas. La motivación de este trabajo fue investigar los factores genéticos y no genéticos que determinan la aparición de la epilepsia en el lince ibérico y controlan su transmisión entre generaciones para poder determinar la mejor manera de gestionar la población cautiva.

Efecto de los factores

El único factor para el que se encontraron evidencias significativas de su efecto sobre la aparición de la epilepsia fue el “Año de nacimiento”. Una interpretación directa de este resultado podría hacer pensar que las condiciones ambientales de cada año tuvieran una influencia importante en la aparición de la epilepsia. Pero mirando a la

Figura 8 se observa que los individuos epilépticos se agrupan en los años centrales (2008-2017) y que en los últimos cuatro años incluidos en el estudio no han aparecido nuevos casos de lince enfermos. Como se explica en el estudio de Mínguez *et al.* (2021), a partir de 2012 se tuvo en cuenta la posible base genética de esta enfermedad y se realizaron variaciones en el programa de apareamiento de la población en cautividad, evitando que se reprodujeran los individuos con epilepsia y que los posibles portadores se apareasen entre sí. Durante algunos años se ha ido detectando a los portadores y restringiendo su emparejamiento, dejando de aparecer individuos epilépticos a partir del año 2018.

La ausencia de efecto significativo para el factor “Lugar de nacimiento” sería una indicación de que el ambiente tiene poca incidencia en la enfermedad y que, en todo caso, la gestión de los programas en los distintos centros es homogénea y que el ambiente es similar en todos ellos. La mayoría de los programas de conservación *ex situ* trabajan con poblaciones subdivididas por problemas logísticos (por ejemplo, ligados a la imposibilidad de tener instalaciones tan grandes como para alojar a todos los individuos) y para reducir el riesgo de perder toda la población si ocurre una catástrofe, como un fuego (Fernández *et al.*, 2008). Pero si las condiciones son diferentes en cada subpoblación podemos tener problemas para realizar una gestión integral del programa, por lo que es crucial estandarizar los protocolos y los ambientes de cría.

El factor “Edad de la madre”, aunque no llegó a la significación ni en la regresión ni en la evaluación BLUP, presenta una clara tendencia cuando se representan los valores mejorantes promedios de los individuos agrupados según la edad de la madre cuando nacieron. La línea de tendencia relaciona a las madres más jóvenes con los valores mejorantes más bajos, es decir, una mayor probabilidad de aparición de la enfermedad en sus hijos. Esta observación entra en conflicto con los resultados de numerosos estudios (Hviid *et al.*, 2017; Ivimey-Cook & Moorad, 2020), que explican la tendencia de las especies, sobre todo mamíferos (incluyendo los humanos), a disminuir la eficacia biológica y supervivencia de los individuos cuanto mayor es la edad de la madre durante la gestación (aunque normalmente se hace referencia a las clases extremas de la distribución). Nuestros resultados podrían explicarse como ocurre con algunas especies de aves (Ivimey-Cook & Moorad, 2020), donde los parentales mayores y con más experiencia de cría tienen un mayor porcentaje de éxito de supervivencia de la descendencia. De hecho, se ha observado también en mamíferos que las madres muy jóvenes tienen mayor dificultad en sacar adelante a sus crías (por ejemplo, en ovejas;

Dwyer, 2014). En el caso del lince ibérico también están descritas las carencias de las hembras jóvenes, siendo incapaces, por ejemplo, de mediar en las peleas entre hermanos que pueden llegar a la muerte de uno de ellos. La deficiente atención de la madre podría disparar la manifestación de la epilepsia en individuos susceptibles.

Efectos de la ancestría y la hibrididad

Los análisis de las covariables ThetaS y ThetaH dieron resultados significativos, con una asociación con la aparición de la epilepsia. Esto se observa tanto en la regresión logística binaria como en la evaluación BLUP. La variable ThetaS muestra una relación entre la aparición de la enfermedad y un mayor porcentaje de ancestría de Sierra Morena. Esto podría deberse a que el fondo genético de la población de Sierra Morena tenga una mayor susceptibilidad a presentar epilepsia. Pero, también, podría ser simplemente causado por una mayor frecuencia del alelo deletéreo en esta población, si admitimos que la enfermedad está determinada fundamentalmente por un gen de efecto grande. Ambas hipótesis concuerdan con el hecho del aislamiento genético de alrededor de 200 años que sufrieron las poblaciones (la población de la Sierra de Andújar en Sierra Morena y la población de Doñana) y el alto nivel de diferenciación que esto puede provocar (Kleinman-Ruiz *et al.*, 2019; Mínguez *et al.*, 2021).

Además, se observa una mayor proporción de del genoma con loci con los dos alelos del mismo origen (calculada con ThetaH) en los individuos epilépticos. Esto podría ser una mera consecuencia de la recesividad de la enfermedad, la mayor frecuencia del alelo en el fondo genético de Sierra Morena, resultando en un aparente efecto de heterosis por la que los individuos híbridos tienen una menor probabilidad de manifestar la epilepsia (Bowman & Falconer, 1960). Esto sería concordante con el estudio de Mínguez *et al.* (2021), en el que se vio que los individuos afectados eran en promedio más endogámicos, con una mayor proporción de ascendencia genética de Sierra Morena y una menor hibridación que los individuos no afectados.

Por lo tanto, los resultados podrían ser compatibles con que los individuos de Sierra Morena o con un porcentaje alto de ancestría de Sierra Morena presenten con mayor frecuencia el alelo deletéreo que provoca la epilepsia idiopática juvenil. De la misma manera, la probabilidad de ser heterocigoto para el locus con efecto es mayor en los individuos cruzados.

Análisis de segregación

En diferentes estudios, como el de Laikre *et al.* (1993), se demuestra la aplicación de análisis avanzados de la genealogía de una población para abordar problemas relativos a la aparición de defectos hereditarios en programas de conservación en cautividad. Entre ellos, el análisis de segregación se ha usado en distintas ocasiones de manera eficaz para la investigación del modo de herencia de una enfermedad (El-Gheriani *et al.*, 2003; Yuan *et al.*, 2000; Cargill *et al.*, 2004). La premisa en este tipo de análisis es la de tener una genealogía completa y fiable, condición que se cumple en el caso del lince ibérico, donde los apareamientos son dirigidos y, además, se han venido realizando test de paternidad basados en un panel de 36 marcadores microsátélites (Kleinman-Ruiz *et al.*, 2019). La limitación que se presentó a la hora de usar el software S.A.G.E. es la de que la genealogía no puede presentar bucles. En poblaciones pequeñas y cerradas con generaciones solapadas (como es el caso de la cría en cautividad del lince ibérico) es inevitable que este tipo de bucles (loops) aparezcan. Se buscaron softwares informáticos alternativos que pudiesen realizar el análisis de segregación y que admitiesen los bucles, como LOKI o MORGAN. Pero estas aplicaciones están diseñadas para tratar con caracteres cuantitativos, lo que no se ajusta a la naturaleza binaria de la definición de la epilepsia en nuestro trabajo (ver una descripción de las capacidades de estos programas en el estudio de Sung & Wijisman, 2007). Por lo tanto, se siguió con la primera opción, aunque eso obligase a utilizar genealogías modificadas, donde se perdió mucha información. Una posibilidad para estudios futuros podría ser la transformación del carácter dicotómico en uno cuantitativo, como se hizo en el estudio de Yuan *et al.* (2000) para analizar la herencia genética de la hipobetalipoproteinemia familiar, o como ocurre en los desafíos frente a infecciones que se realizan en acuicultura (Doeschl-Wilson *et al.*, 2021), donde el carácter resistencia puede tratarse como binario (vivo o muerto al final del desafío) o como cuantitativo (número de días desde la infección hasta la muerte del animal). De forma similar, se podría elegir un carácter asociado, como la edad de manifestación de la enfermedad, para sustituir al carácter binario “Epilepsia”.

El análisis de segregación, que se realizó para comparar los distintos modos de transmisión del supuesto gen que provoca la epilepsia, mostró resultados significativos. Aunque los resultados fueron muy parecidos entre los distintos modelos y no se podía observar uno en concreto que sobresaliese del resto, en las cuatro genealogías testadas el modelo más parsimonioso fue el modelo de transmisión mendeliana (es decir, uno o pocos

loci). El estudio de El-Gheriani *et al.* (2003) explica que los resultados más bajos del AIC (Akaike's Information Criterion), aunque no sean muy diferentes, son los más parsimoniosos. La baja cantidad de datos disponibles y el hecho de que las genealogías tuvieron que ser modificadas podrían haber disminuido la precisión de los análisis y el soporte para los modelos seleccionados.

Dentro del modelo de transmisión mendeliana, el modelo más parsimonioso para los 4 casos es el de A dominante, es decir que el modelo está restringido a $\beta_{AA} = \beta_{AB}$. Por lo tanto, podemos proponer que la herencia del carácter es debida principalmente a un gen con transmisión mendeliana y los individuos heterocigotos (AB) presentan el mismo fenotipo que el homocigoto dominante (AA), que es un fenotipo no afectado por la epilepsia.

Hay que recordar que esto concuerda con los resultados antes mencionados sobre la variable ThetaH. A la vista de que el modelo más probable implica que el alelo deletéreo sea recesivo (la enfermedad es autosómica recesiva) la menor probabilidad de presentar la enfermedad de los individuos cruzados es la manifestación de la heterosis correspondiente a este tipo de caracteres.

El conocimiento del modo de herencia de una enfermedad es importante para la correcta gestión de nuevos programas de conservación de la especie e, incluso, puede dar indicios para el estudio de enfermedades similares en otras especies (Kardos *et al.*, 2021).

Evaluaciones BLUP y ssGBLUP

El principal resultado del trabajo han sido las evidencias de la existencia de un gen mayor con efecto sobre la aparición de la epilepsia en el lince ibérico. Los resultados de la evaluación BLUP usando un modelo umbral refuerzan esta idea, al marcar una clara distinción en las estimaciones de los valores mejorantes entre individuos epilépticos y los individuos no epilépticos (distribución bimodal). Además, se observa que, dentro de los individuos no epilépticos, los fundadores que se capturaron de Sierra Morena aparecen con valores más bajos. Esto sería compatible con el análisis de la covariable ThetaS, donde el porcentaje de genoma de Sierra Morena estaba asociado a una mayor prevalencia de la epilepsia. Los valores mejorantes, por tanto, permiten detectar de una forma muy precisa aquellos individuos con mayor probabilidad de tener descendencia afectada por la enfermedad, sin necesidad de esperar a que tengan hijos con epilepsia para saber que son portadores. También, la elevada heredabilidad obtenida en el BLUP sería una

evidencia extra de la existencia de este gen de efecto mayor en la determinación de la enfermedad.

Sin embargo, al realizar la evaluación incluyendo los datos genómicos mediante el método ssGBLUP (Legarra *et al.*, 2014) desaparece la distribución bimodal obtenida en el BLUP, con los individuos afectados obteniendo, en general, las estimaciones más bajas, pero no generando una distribución separada del resto de individuos. Esto se puede deber principalmente al número de datos, tanto del número de individuos genotipados como del número de SNPs, que se han manejado en el estudio y que no son suficientes para poder hacer una evaluación genómica eficaz. El uso de un número limitado de marcadores para la selección genómica puede llevar a una baja precisión en las estimas de los valores mejorantes (Gómez-Romano *et al.*, 2013). La Estación Biológica de Doñana – CSIC trabaja actualmente para aumentar el número de individuos genotipados y, también, el número total de marcadores. De esta forma, teniendo disponibles un mayor número de SNPs y utilizando datos de la población completa del lince ibérico, será posible hacer valoraciones más precisas que ayuden a mejorar la selección de los individuos en los programas de cría en cautividad.

Otros usos de los datos genómicos

Si la epilepsia idiopática juvenil está provocada en mayor medida por el efecto de un gen mayor, sería muy relevante detectar el gen responsable. De esta manera se podría genotipar directamente este locus e identificar inequívocamente a los portadores del alelo deletéreo. Una de las estrategias para llegar a ese objetivo es la de detectar marcadores moleculares que estén asociados a la manifestación del carácter. Aquellos con un mayor efecto aparente señalarán la región genómica en la que se podría encontrar la mutación causal (estrategia del candidato posicional). Hay que recordar que los SNPs usados en este trabajo habían sido elegidos por estar en las regiones de los genes homólogos de genes candidatos asociados a la enfermedad de la epilepsia en humanos y otras especies domésticas (estrategia del candidato funcional). Por esa circunstancia cabría esperar que la potencia de estos marcadores fuera mayor, aunque la limitada cantidad de datos ya comentada puede condicionar su eficacia.

De cualquier manera, se incorporó en el estudio una parte de análisis de los marcadores moleculares disponibles. Tras el filtrado de los errores encontrados a través del paquete MARKER INFO y analizar los distintos SNPs con los paquetes SIBPAL y TDTEX, se

identificaron 8 de los 59 marcadores con resultados significativos en al menos uno de los análisis realizados. De cualquier manera, son necesarios más estudios para poder confirmar la asociación de alguno de los SNPs y explorar el uso directo de los marcadores en la gestión o intentar encontrar la mutación causal.

Por otro lado, el paquete *FREQ* detectó 28 marcadores en los que sus frecuencias genotípicas eran compatibles con las esperadas por efecto de una consanguinidad aumentada. El análisis de las frecuencias genotípicas y alélicas en la población analizada mostró que estos SNPs no estaban en Equilibrio de Hardy-Weinberg y, con un test de máxima verosimilitud, se destacó la presencia de consanguinidad en la población. La desviación del equilibrio de HW puede deberse entre otras causas a la selección para un locus que esté ligado al marcador. De esa manera sería otra señal para dirigir la búsqueda del gen que controla la epilepsia. Hay que destacar que, debido a que la gestión que se lleva a cabo de la población *ex situ*, que reduce el aumento de la consanguinidad mediante selección por Optimal Contribution (Sonneson *et al.*, 2003) y apareamientos de mínimo parentesco, el número de individuos consanguíneos (genealógicos) es muy bajo. Siendo así, la posibilidad de correlacionar el nivel de consanguinidad genealógica con la prevalencia de la epilepsia es muy baja y el uso de marcadores moleculares se manifiesta como una herramienta potente para esos estudios.

El análisis que se realizó con el paquete *SIBPAL* también mostró un efecto significativo de las covariables *ThetaS* y *ThetaH* sobre la aparición de la enfermedad para la mayoría de marcadores estudiados. Esto es compatible con el alto nivel de diferenciación genética que se observa entre las dos poblaciones remanentes de lince ibérico (Kleinman-Ruiz *et al.*, 2019).

Los marcadores moleculares ya se han estado utilizando en el programa de conservación del lince ibérico, ya sea detectando la diferenciación genética entre las poblaciones remanentes que fueron el origen de la población *ex situ*, para estimar el parentesco entre los individuos fundadores, monitorizar el progreso del programa o para trazar la genealogía de los descendientes en la naturaleza de los lince liberados desde los centros de cría en cautividad. (Kleinman-Ruiz *et al.*, 2019).

Estrategias de manejo actuales y futuras

La epilepsia idiopática juvenil en la población de lince ibérico es un trastorno que tiene un gran impacto en el manejo del programa de cría. Actualmente se evita el uso de los

individuos afectados y el apareamiento entre los individuos sospechosos de ser portadores (Mínguez *et al.*, 2021). Esta selección en contra de la enfermedad parece ser eficiente a corto plazo, ya que en los últimos años no han aparecido nuevos individuos epilépticos, aunque estas limitaciones pueden provocar una mayor pérdida de variabilidad y un aumento de consanguinidad en la población.

Anteriormente ya se había estudiado la determinación genética del patrón del pelaje en la población, tratando el carácter principal como un carácter cuantitativo (Colejo Durán, 2018), pero este trabajo es uno de los primeros en utilizar las técnicas de genética cuantitativa en el lince ibérico para tratar un carácter umbral, como es el caso de la epilepsia idiopática juvenil. Se debe añadir que, aunque el estudio haya contado con el mayor número de datos posible, el número de individuos, y sobre todo de individuos afectados por la epilepsia, es muy reducido.

Es importante tener en cuenta que el objetivo principal de un programa de conservación consiste en maximizar la probabilidad de supervivencia y adaptabilidad de la especie mediante la maximización de la diversidad genética de la población. Pero a la vez es necesario eliminar la información genética deletérea. Hay que buscar una solución de compromiso que equilibre los dos objetivos. Cuanta mayor sea la información que se tenga sobre la base genética del carácter, mejor se podrá hacer la gestión. Es por esto que este estudio sugiere incluir los datos de los valores mejorantes en los programas de selección y apareamiento, y de esta forma evitar la aparición de la epilepsia con la menor pérdida de diversidad genética posible. En el estudio de Sonesson *et al.* (2003) se propuso usar la metodología OCS (Optimal Contribution Selection) para seleccionar en contra de un alelo deletéreo con una restricción en la tasa de consanguinidad (ΔF) si se dispone de una estima del valor mejorante para la enfermedad. De esta forma, se maximiza la respuesta de selección, es decir, disminuye considerablemente el riesgo a padecer la enfermedad, pero manteniendo alta la diversidad genética de la población y restringiendo el aumento de la tasa de consanguinidad. En el presente estudio se han estimado los valores mejorantes de todos los individuos de la población por lo que sería posible usar esta estrategia en la selección de los reproductores de próximas generaciones. Alternativamente, se podría seguir maximizando la variabilidad genética transmitida, pero poniendo una restricción en el EBV mínimo de los individuos seleccionados o el promedio de estos valores. En el caso de que se pudiese genotipar el verdadero gen causal

se podría implementar OCS pero haciendo selección para el conteo de alelos deletéreos (es decir, para reducir la frecuencia de estos en el conjunto de seleccionados).

CONCLUSIONES

La epilepsia idiopática juvenil parece tener un origen genético en la población de lince ibérico. Además, hay evidencias de la presencia de un gen de efecto mayor subyacente a la enfermedad.

Los resultados son compatibles con un gen mayor bialélico con un modelo de transmisión mendeliana y acción génica dominante. Por tanto, los genotipos β_{AA} y β_{AB} tendrían el mismo fenotipo “no epiléptico”. El alelo deletéreo sería recesivo y solo se expresaría en homocigosis

El alelo deletéreo parece estar ligado a una de las poblaciones remanentes del lince ibérico (al menos con una frecuencia mayor), teniendo los individuos de Sierra Morena y descendientes un mayor riesgo de padecer la enfermedad. La consanguinidad parece ser otro factor determinante en la aparición de la epilepsia dado el carácter recesivo de la enfermedad.

Los futuros programas de conservación han de tener en cuenta la información genética para seleccionar los individuos y para la realización de esquemas de apareamiento, siendo los objetivos más importantes la restricción del aumento de la tasa de consanguinidad y maximizar la variabilidad genética en la población.

BIBLIOGRAFÍA

- Abascal, F., Corvelo, A., Cruz, F., Villanueva-Cañas, J.L., Vlasova, A., *et al.* 2016. Extreme genomic erosion after recurrent demographic bottlenecks in the highly endangered Iberian Lynx. *Genome Biology* 17, 251.
- Akesson, M., Liberg, O., Sand, H., Wabakken, P., Bensch, S. *et al.* 2016. Genetic rescue in a severely inbred Wolf population. *Molecular Ecology* 25, 4745-4756.
- Axenovich, T.I., Zaidman, A.M., Zorkoltseva, I.V., Tregubova, I.L., Borodin, P.M. 1999. Segregation analysis of idiopathic scoliosis: Demonstration of a major gene effect. *American Journal of Medical Genetics* 86, 389-394.
- Axenovich, T.I., Zorkoltseva, I.V., Liu, F., Kirichenko, A.V., Aulchenko, Y.S. 2008. Breaking loops in large complex pedigrees. *Human Heredity* 65 (2), 57-65.
- Barnosky, A.D., Matzke, N., Tomiya, S., Wogan, G.O.U, Swartz, B. *et al.* 2011. Has the Earth's sixth mass extinction already arrived?. *Nature* 471, 51-57.
- Belonsky, G.M., Kennedy, B.W. 1988. Selection on individual phenotype and best linear unbiased predictor of breeding value in a closed swine herd. *Journal of Animal Science*. 66, 1124-1131.
- Berendt, M., Farquhar, R.G., Mandigers, P.J.J., Pakozdy, A., Bhatti, S.F.M., *et al.* 2015. International veterinary epilepsy task force consensus report on epilepsy definition, classification and terminology in companion animals. *BMC Veterinary Research* 11, 182.
- Biere, A., Van Andel, J., Van de Koppel, J. 2012. Populations: ecology and genetics. En Van Andel, J. (redactor), Aronson, J. (redactor), *Restoration Ecology: The New Frontier* (pp. 73-86).
- Blasco, A. 2021. *Mejora genética animal*. Síntesis, Madrid, España.
- Blomqvist, D., Pauliny, A., Larsson, M., Flodin, L.-A. 2010. Trapped in the extinction vortex? Strong genetic effects in a declining vertebrate population. *BCM Evolutionary Biology* 10, 33.

- Bowman, J.C., Falconer, D.S. 1960. Inbreeding depression and heterosis of litter size in mice. *Genetic Research* 1, 262-274.
- Browning, S.R., Browning, B.L. 2012. Identity by descent between distant relatives: detection and applications. *The Annual Review of Genetics* 46, 617-633.
- Caballero, A., Bravo, I., Wang, J. 2017. Inbreeding load and purging: implications for the short-term survival and the conservation management of small populations. *Heredity* 118, 177-185.
- Cargill, E.J., Famula, T.R., Strain, G.M., Murphy, K.E. 2004. Heritability and segregation analysis of deafness in U.S. Dalmatians. *Genetics* 166, 1385-1393.
- Casas-Marce, M., Marmesat, E., Soriano, L., Martínez-Cruz, B., Lucena-Perez, M., *et al.* 2017. Spatiotemporal dynamic of genetic variation in the Iberian Lynx along its path to extinction reconstructed with ancient DNA. *Molecular Biology and Evolution* 24 (11), 2893-2907.
- Ceballos, G., Ehrlich, P.R., Raven, P.H. 2020. Vertebrates on the brink as indicators of biological annihilation and the sixth mass extinction. *PNAS* 117 (24), 13596-13602.
- Chu, E.T., Simpson, M.J., Diehl, K., Page, R.L., Sams, A.J., *et al.* 2019. Inbreeding depression causes reduced fecundity in Golden retrievers. *Mammalian Genome* 30, 166-172.
- Cingolani, P., Platts, A., Wang le, L., Coon, M., Nguyen, T., *et al.* 2012. A program for annotating and predicting the effects of single nucleotide polymorphisms. *SnEff*. *Fly* 6, 80-92.
- Clayton, D. 1999. A generalization of the transmission/disequilibrium test for uncertain-haplotype transmission. *The American Journal of Human Genetics* 65, 1170-1177.
- Colejo Durán, L. 2018. Análisis genético de los patrones de pelaje en el lince ibérico (*Lynx pardinus*) [Trabajo de Fin de Máster, Universidad de Granada].
- Comizzoli, P. 2017. Biobanking and fertility preservation for rare and endangered species. *Animal Reproduction* 14 (1), 30-33.

- Cunningham, F., Allen, J.E., Allen, J., Alvarez-Jarreta, J., Ridwan, M., *et al.* 2022. Ensembl 2022. *Nucleic Acids Research* 50 (1), D988-D995.
- Delgado Bermejo, J.V., Martínez Martínez, M.A., Rodríguez Galván, G., Stemmer, A., Navas González, F.J., *et al.* 2019. Organization and management of conservation programs and research in domestic animal genetic resources. *Diversity* 11, 235.
- Diaz, S., Fargione, J., Chapin III, F.S., Tilman, D. 2006. Biodiversity loss threatens human well-being. *PLoS Biol* 4 (8), e277.
- Doeschl-Wilson, A., Knap, P.W., Opriessnig, T., More, S.J. 2021. Review: Livestock disease resilience: from individual to herd level. *Animal* 15 (1), 100286.
- Dwyer, C.M. 2014. Maternal behavior and Lamb survival: from neuroendocrinology to practical application. *Animal* 8 (1), 102-112.
- El-Gheriani, A.A., Maher, B.S., El-Gheriani, A.S., Sciote, J.J., Abu-shahba, F.A., *et al.* 2003. Segregation analysis of mandibular prognathism in Libya. *Journal of Dental Research* 82(7), 523-527.
- Estes, J.A., Burdin, A., Doak, D.F. 2015. Sea otters, kelp forests, and the extinction of Steller's sea cow. *PNAS* 113 (4), 880-885.
- Farhadinia, M.S., Johnson, P.J., Zimmermann, A., McGowan, P.J.K., Meijaard, E., *et al.* 2020. *Ex situ* management as insurance against extinction of mammalian megafauna in an uncertain world. *Conservation Biology* 34 (4), 988-996.
- Fernández, J., Toro, M. A., Caballero, A. (2008). Management of subdivided populations in conservation programs: development of a novel dynamic system. *Genetics* 179, 683-692.
- Figueiredo, A.M., Madeira de Carvalho, L., González, M.J.P., Torres, R.T., Pla, S., *et al.* 2021. Parasites of the reintroduced Iberian lynx (*Lynx pardinus*) and sympatric mesocarnivores in Extremadura, Spain. *Pathogens* 10, 274.
- Frankham, R., Briscoe, D.A., Ballou, J.D. 2002. Introduction to conservation genetics. Cambridge University Press.
- Fuerst-Waltl, B., Fuerst, C. 2012. Effect of inbreeding depression on survival of Austrian Brown Swiss calves and heifers. *Journal of Dairy Science* 95, 6086-6092.

- Geret, C.P., Cattori, V., Meli, M.L., Riond, B., Martínez, F., *et al.* 2011. Feline leukemia virus outbreak in the critically endangered Iberian lynx (*Lynx pardinus*): high-throughput sequencing of envelope variable region A and experimental transmission. *Archives of Virology* 156 (5), 839-854.
- Ginsburg, E., Livshits, G. 1999. Segregation analysis of quantitative traits. *Annals of Human Biology* 26 (2), 103-129.
- Gómez-Romano, F., Villanueva, B., de Cara, M.A., Fernández, J. 2013. Maintaining genetic diversity using molecular coancestry: the effect of marker density and effective population size. *Genetic Selection Evolution* 45, 38.
- He, Z., O’Roak, B.J., Smith, J.D., Wang, G., Hooker, S., *et al.* 2014. Rare-Variant extensions of the transmission disequilibrium test: application to autism exome sequence data. *The American Journal of Human Genetics* 94, 33-46.
- Hedrick, P.W., García-Dorado, A. 2016. Understanding inbreeding depression, purging, and genetic rescue. *Trends in Ecology & Evolution* 31 (12), 940-952.
- Henderson, C.R. 1975. Best linear unbiased estimation and prediction under a selection model. *Biometrics* 31, 423-447.
- Hoffmann, M., Hilton-Taylor, C., Angulo, A., Böhm, M., Brooks, T.M. *et al.* 2010. The impact of conservation on the status of the world’s vertebrates. *Science* 330, 1503-1509.
- Hofreiter, M., Barnes, I. 2010. Diversity lost: are all Holarctic large mammal species just relict populations? *Journal of Biology* 9, 21.
- Huffmeyer, A.A. 2021. The impacts of inbreeding and hybridization on sperm quality in felids and canids (Tesis doctoral). Universidad de California en Los Ángeles, Los Ángeles, E.E.U.U. <https://escholarship.org/uc/item/2fv0g0dz>
- Huffmeyer, A.A., Sikich, J.A., Vickers, T.W., Riley, S.P.D, Wayne, R.K. 2022. First reproductive signs of inbreeding depression in Southern California male mountain lions (*Puma concolor*). *Theriogenology* 177, 157-164.
- Hviid, M.M., Skovlund, C.W., Mørch, L.S., Lidegaard, Ø. 2017. Maternal age and child morbidity: A Danish national cohort study. *PLoS ONE* 12 (4), e0174770.

- IBM Corp. Released 2021. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 28.0. Armonk, NY: IBM Corp.
- Ivimey-Cook, E., Moorad, J. 2020. The diversity of maternal-age effects upon pre-adult survival across animal species. *The Royal Society. Collection 287*, 20200972.
- Jiménez, M.A., Sánchez, B., Pérez, M.D., García, P., López, J.V., *et al.* 2008. Membranous glomerulonephritis in the Iberian lynx (*Lynx pardinus*). *Veterinary Immunology and Immunopathology* 121, 34-43.
- Jokinen, T.S., Metsähonkala, L., Bergamasco, L., Viitmaa, R., Syrjä, P., *et al.* 2007. Benign familial juvenile epilepsy in Lagotto Romagnolo dog. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 21, 464-471.
- Kalinowski, S.T., Taper, M.L., Marshall, T.C. 2010. Corrigendum. *Molecular Ecology* 19, 1512.
- Kardos, M., Armstrong, E.E., Fitzpatrick, S.W., Hauser, S., Hedrick, P.W., *et al.* 2021. The crucial role of genome-wide genetic variation in conservation. *PNAS* 118 (48), e2104642118.
- Kleinman-Ruiz, D. 2020. De la genética a la genómica en la conservación del lince ibérico [Tesis doctoral, Universidad de Sevilla] <https://hdl.handle.net/11441/125118>
- Kleinman-Ruiz, D., Lucena-Perez, M., Villanueva, B., Fernández, J., Saveljev, A.P. 2022. Purging of deleterious burden in the endangered Iberian lynx. *PNAS* 119 (11), e2110614119.
- Kleinman-Ruiz, D., Soriano, L., Casas-Marce, M., Scychta, C., Sánchez, I. *et al.* 2019. Genetic evaluation of the Iberian lynx *ex situ* conservation programme. *Heredity* 123, 647-661.
- LaBar, T., Adami, C. 2017. Evolution of drift robustness in small populations. *Nature Communications* 8, 1012.
- Laikre, L. 1999. Hereditary defects and conservation genetic management of captive populations. *Zoo Biology* 18, 81-99.

- Laikre, L., Ryman, N., Thompson, E.A. 1993. Hereditary blindness in a captive Wolf (*Canis lupus*) population: Frequency reduction of a deleterious allele in relation to gene conservation. *Conservation Biology* 7 (3), 592-601.
- Leberg, P.L., Firmin, B.D. 2008. Role of inbreeding depression and purging in captive breeding and restoration programmes. *Molecular Ecology* 17, 334-343.
- Legarra, A., Christensen, O.F., Aguilar, I., Misztal, I. 2014. Single step, a general approach for genomic selection. *Livestock Science* 166, 54-65.
- MacDougall, A.S., McCann, K.S., Gellner, G., Turkington, R. 2013. Diversity loss with persistent human disturbance increases vulnerability to ecosystem collapse. *Nature* 494, 86-89.
- Macedo, F.L., Christensen, O.F., Astruc, J.-M., Aguilar, I., Masuda, Y., *et al.* 2020. Bias and accuracy of dairy sheep evaluations using BLUP and ssGBLUP with metafounders and unknown parent groups. *Genetic Selection Evolution* 52, 47.
- Mancisidor, B., Cruz, A., Gutiérrez, G., Burgos, A., Morón, J.A., *et al.* 2021. ssGBLUP method improves the accuracy of breeding value prediction in Huacaya alpaca. *Animals* 11, 3052.
- Martínez, F., Manteca, X., Pastor, J. 2013. Retrospective study of morbidity and mortality of captive Iberian lynx (*Lynx pardinus*) in the *ex situ* conservation programme (2004-June 2010). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 44 (4), 845-852.
- McGowan, P.J.K., Traylor-Holzer, K., Leus, K. 2017. IUCN Guidelines for determining when and how *ex situ* management should be used in species conservation. *Conservation Letters* 10 (3), 361-366.
- Mestanza-Ramón, C., Henkanaththege, S.M., Vásquez Duchinela, P., Vargas Tierras, Y., Sánchez Capa, M., *et al.* 2020. *In-Situ* and *Ex-situ* biodiversity conservation in Ecuador: A review of policies, actions and challenges. *Diversity* 12, 315.
- Meuwissen, T.H.E., Hayes, B.J., Goddard, M.E. 2001. Prediction of total genetic value using genome-wide dense marker maps. *Genetics* 157 (4), 1819-1829.

- Millán, J., Candela, M.G., Palomares, F., Cubero, M.J., Rodríguez, A., *et al.* 2009. Disease threats to the endangered Iberian lynx (*Lynx pardinus*). The Veterinary Journal 182, 114-124.
- Mínguez, J.J., El Bouyafrouri, Y., Godoy, J.A., Rivas, A., Fernández, J., *et al.* 2021. Benign juvenile idiopathic epilepsy in captive Iberian lynx (*Lynx pardinus*) in the *ex situ* conservation program (2005-2019). BMC Veterinary Research 17, 165.
- Mínguez, J.J., Martínez, F., Vargas, A., Wessmann, A., Lorenzo, V. 2019. Benign juvenile focal epilepsy in a captive Iberian lynx (*Lynx pardinus*). Veterinary Record Case Report 7, e000870.
- Mishra, S.P., Mishra, C.M., Nayak, G., Sahoo, N., Sahoo, S.K. 2017. Effect of inbreeding on several fitness traits and disease susceptibility in captive tiger (*Panthera tigris*) population at Nandankanan zoological park, Odisha. International Journal of Livestock Research 7 (7), 241-250.
- Misztal, I., Aggrey, S.E., Muir, W.M. 2013a. Experiences with a single-step genome evaluation. Poultry Science 92, 2530-2534.
- Misztal, I., Tsuruta, S., Aguilar, I., Legarra, A., VanRaden, P.M., *et al.* 2013b. Methods to approximate reliabilities in single-step genomic evaluation. Journal of Dairy Science 96 (1), 647-654.
- Misztal, I., Tsuruta, S., Lourenco, D.A.L., Masuda, Y., Aguilar, I., *et al.* 2018. Manual for BLUPf90 family programs. University of Georgia. <http://nce.ads.uga.edu/wiki/doku.php?id=documentation>
- Navarro, J.L., Lèche, A., Della Costa, N.S., Vera Cortez, M., Marin, R.H., *et al.* 2019. State of the art knowledge in adrenocortical and behavioral responses to environmental challenges in a threatened South American ratite: Implications to *in situ* and *ex situ* conservation. General and Comparative Endocrinology 273, 52-60.
- Peña, L., García, P., Jiménez, M.A., Benito, A., Pérez, M.D., *et al.* 2006. Histopathological and immunohistochemical findings in lymphoid tissues of the endangered Iberian lynx (*Lynx pardinus*). Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases 29, 114-126.

- Pimm, S.L., Jenkins, C.N., Abell, R., Brooks, T.M., Gittleman, L.N. *et al.* 2014. The biodiversity of species and their rates of extinction, distribution, and protection. *Science* 344, 1246752.
- Rodríguez, A., Calzada, J. 2015. *Lynx pardinus*. The IUCN Red List of Threatened Species 2015, e.T12520A174111773.
- R Core Team. 2022. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing. Viena, Austria. <https://www.R-project.org>
- Roelke, M.E., Johnson, W.E., Millán, J., Palomares, F., Revilla, E., *et al.* 2008. Exposure to disease agents in the endangered Iberian lynx (*Lynx pardinus*). *European Journal of Wildlife Research* 54, 171-178.
- Roelke, M.E., Martenson, J.S., O'Brien, S.J. 1993. The consequences of demographic reduction and genetic depletion in the endangered Florida panther. *Current Biology* 3 (6), 340-350.
- Ruiz-López, M.J., Gañan, N., Godoy, J.A., Del Olmo, A., Garde, J., *et al.* 2012. Heterozygosity-Fitness correlations and inbreeding depression in two critically endangered mammals. *Conservation Biology* 26 (6), 1121-1129.
- S.A.G.E. (2021) Statistical Analysis for Genetic Epidemiology, Release 6.4.2: <http://darwin.cwru.edu>
- Schulte-Hostedde, A.I., Mastro Monaco, G.F. 2015. Integrating evolution in the management of captive zoo populations. *Evolutionary Applications* 8, 413-422.
- Sonneson, A.K., Janss, L.L.G., Meuwissen, T.H.E. 2003. Selection against genetic defects in conservation schemes while controlling inbreeding. *Genetic Selection Evolution* 35, 353-368.
- Sung, Y.J., Wijsman, E.M. 2007. Accounting for epistasis in linkage analysis of general pedigrees. *Human Heredity* 63, 144-152.
- Todd, E.T., Ho, S.Y.W., Thomson P.C., Ang, R.A., Velie, B.D., *et al.* 2018. Founder-specific inbreeding depression affects Racing performances in Thoroughbred horses. *Scientific Reports* 8, 6167.

- Van Coillie, S., Galbusera, P., Roeder, A.D., Schempp, W., Stevens, J.M.G., *et al.* 2008. Molecular paternity determination in captive bonobos and the impact of inbreeding on infant mortality. *Animal Conservation* 11, 306-312.
- Vargas, A., Breitenmoser, C., Breitenmoser, U. 2009. Conservación *ex situ* del lince ibérico: Un enfoque multidisciplinar. Fundación Biodiversidad, Madrid, España.
- Wang, J., Ryman, N. 2001. Genetic effects of multiple generations of supportive breeding. *Conservation Biology* 15, 1619-1631.
- Whiteley, A.R., Fitzpatrick, S.W., Funk, W.C., Tallmon, D.A. 2015. Genetic rescue to the rescue. *Trends in Ecology & Evolution* 30 (1), 42-49.
- Wilson, A.J., Réale, D., Clements, M.N., Morrissey, M.M., Postma, E., *et al.* 2010. An ecologist's guide to the animal model. *Journal of Animal Ecology* 79, 13-26.
- Yuan, B., Neuman, R., Duan, S.H., Weber, J.L., Kwok, P.Y., *et al.* 2000. Linkage of a gene for familial hypobetalipoproteinemia to chromosome 3p21.1-22. *The American Society of Human Genetics* 66, 1699-1704.