



Consejo Directivo
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS
Universidad Nacional de La Pampa

RESOLUCIÓN N° 403/2023

GENERAL PICO, 07 de Diciembre de 2023.-

VISTO:

La evaluación positiva enviada por las/os integrantes del Comité Científico de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Pampa, respecto del Proyecto de Investigación: “*Expresión génica diferencial entre epidídimo y testículo en padrillos*” y,

CONSIDERANDO:

Que el proyecto enunciado en el Visto estará bajo la dirección de la Dra. Guillermina BILBAO, participando en carácter de Investigador el Dr. Julián BARTOLOMÉ; en carácter de Asesora la DVM Maria Soledad FERRER (College of Veterinary Medicine, University of Georgia), en carácter de Tesista la M.V. Karen MORAN y en carácter de Asistentes de Investigación las estudiantes de la carrera Medicina Veterinaria: Rocío Belén FRANK y Karen Jaqueline FUCHS.

Que tendrá una duración de veinticuatro (24) meses, a partir del 01 de enero de 2024 y hasta el 31 de diciembre de 2025.

Que de acuerdo a la presentación el citado proyecto es de Investigación Básica.

Que participan en su desarrollo el Instituto de Medicina Reproductiva Veterinaria (IMERVET), la Cátedra de Reproducción Animal, el Laboratorio de Reproducción Animal y el Centro de Investigación y Desarrollo de Fármacos (CIDEF).

Que también participan el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) CCT Patagonia Confluencia y el College of Veterinary Medicine, University of Georgia (UGA), Estados Unidos.

Que el citado proyecto ha sido presentado de acuerdo con las normas vigentes y aprobado por el Comité Científico de la Facultad.

Que el Artículo 5° Anexo I de la Resolución N° 100/99 y su modificatoria N° 88/02 del Consejo Superior, estipula que: “*Todo Programa y todo Proyecto de Investigación que obtenga dos (2) evaluaciones externas favorables será acreditado mediante resolución del Consejo Directivo de cada Facultad a la que pertenezca*”.

Que cuenta con dos (2) evaluaciones externas satisfactorias, de acuerdo con lo previsto en la Resolución N° 100/99 y N° 88/02 del Consejo Superior de la Universidad Nacional de La Pampa.

Que las evaluaciones fueron realizadas por la Dra. Elizabeth BREININGER (UBA) y el Dr. Marcelo MIRAGAYA (UBA).

Que en Sesión Ordinaria del Consejo Directivo del día 07 de Diciembre de 2023, puesta la acreditación del Proyecto de Investigación a consideración de los/as Sres/as. Consejeros/as, se aprueba por unanimidad.



Consejo Directivo
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS
Universidad Nacional de La Pampa

Corresponde a Resolución N° 403/2023

//2.-

POR ELLO:

EL CONSEJO DIRECTIVO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS

RESUELVE:

ARTICULO 1º: Acreditar como Proyecto de Investigación de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Pampa, el proyecto denominado: "*Expresión génica diferencial entre epididimo y testículo en padrillos*" dirigido por la Dra. Guillermina BILBAO, participando en carácter de Investigador el Dr. Julián BARTOLOMÉ; en carácter de Asesora la DVM Maria Soledad FERRER (College of Veterinary Medicine, University of Georgia), en carácter de Tesista la M.V. Karen MORAN y en carácter de Asistentes de Investigación las estudiantes de la carrera Medicina Veterinaria: Rocío Belén FRANK y Karen Jaqueline FUCHS, el cual tiene quince (15) folios y consta en el Anexo de la presente Resolución.

ARTICULO 2º: El proyecto tendrá una duración de veinticuatro (24) meses, a partir del 01 de enero de 2024 y hasta el 31 de diciembre de 2025.

ARTICULO 3º: Justificar los gastos que se produzcan de pasajes, viáticos, combustibles, aparatos, material de laboratorio, etc., del citado proyecto.

ARTICULO 4º: Regístrese, comuníquese. Tomen conocimiento los/as interesados/as. Pase a Secretaría de Investigación y Posgrado, Dra. Guillermina BILBAO. Cumplido, archívese.

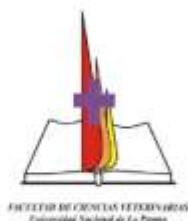
Presidente
Consejo Directivo
Facultad de Ciencias Veterinarias
UNLPam



Consejo Directivo
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS
Universidad Nacional de La Pampa

Corresponde a Resolución N° 403/2023

ANEXO



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PAMPA

Facultad de Ciencias Veterinarias

"EXPRESIÓN GÉNICA DIFERENCIAL ENTRE EPIDÍDIMO Y TESTÍCULO EN
PADRILLOS"

Integrantes

Firmas

Bartolomé, Julián Alberto

Bilbao, Maria Guillermina

Ferrer, Maria Soledad

Franck, Rocio Belén

FRANCK, ROCIO

Fuchs, Karen Jaqueline

Moran, Karen Daiana



Consejo Directivo
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS
Universidad Nacional de La Pampa

Corresponde a Resolución Nº 403/2023



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PAMPA
Facultad de Ciencias Veterinarias

1. IDENTIFICACIÓN del PROYECTO

- 1.1. **TÍTULO del PROYECTO:** "Expresión génica diferencial entre epidídimo y testículo en padrillos"
- 1.2. **TIPO de INVESTIGACIÓN:** Básica.
- 1.3. **CAMPO de APLICACIÓN PRINCIPAL:** Reproducción equina.
- 1.4. **CAMPOS de APLICACIÓN POSIBLES:** Biotecnologías reproductivas.
- 1.5 **ÁREA DE CONOCIMIENTO:** Agropecuarias y del Ambiente.
- 1.6 **SUBÁREA DE CONOCIMIENTO:** Ciencias Veterinarias.

2. INSTITUCIONES y PERSONAL que INTERVIENEN en el PROYECTO

2.1. AREAS, DEPARTAMENTOS y/o INSTITUTOS:

- Instituto de Medicina Reproductiva Veterinaria (IMERVET).
- Cátedra de Reproducción Animal.
- Laboratorio de Reproducción Animal.
- Centro de Investigación y Desarrollo de Fármacos (CIDEF).

2.2. OTRAS INSTITUCIONES:

- CONICET, CCT Patagonia Confluencia.
- College of Veterinary Medicine, University of Georgia (UGA), Estados Unidos.

2.3. EQUIPO de TRABAJO

2.3.1 . INTEGRANTES

Apellido y Nombre	CUIL	Título Académico	Categ Invest	Respon-sabilidad	Cátedra o Institución	Cargo y Dedicación	Tiempo dedicación hs./semana
BILBAO, MARÍA GUILLERMINA	27-28004454/2	Lic.; Dra.	IV	D	CONICET – Cát. Física Biológica	Inv. Adj. Exclusivo Prof. Adj. Simple	4
BARTOLOMÉ, JULIÁN A.	20-17310980/7	M.V.; Ph.D.	II	I	Cát. Reproducción Animal.	Prof. Titular Semi-exclusivo	4



Corresponde a Resolución N° 403/2023

FERRER MARÍA SOLEDAD		DVM, MS, DACT	-	A	College of Veterinary Medicine (University of Georgia)	Associate Professor, Theriogenology	2
MORÁN, KAREN DAIANA	27-34536905/3	M.V.	-	Tesista	CONICET - Cát. Reproducción Animal	Becaria doc. Exclusiva - Ayte. 1° Simple	40
FRANK ROCIO BELÉN	27-42446947/0	Estudiante Medicina Veterinaria	-	AI			2
FUCHS KAREN JAQUELINE	27-41416774/3	Estudiante Medicina Veterinaria	-	AI			2

D: Director, CD: Co-Director, A: Asesor, I: Investigador, AI: Asistente de Investigación.

2.3.1. BECARIOS:

Apellido y Nombre	Organismo que Financia	Tipo de Beca	Director	Tiempo de Dedicación Hs./Sem.
MORAN KAREN DAIANA	CONICET	Beca Interna Doctoral	Julián Alberto Bartolomé	40 h

2.3.2. TESISTAS:

Apellido y Nombre	Título Académico al que aspira	Título Proyecto de Tesis	Organismo	Director	Tiempo de Dedicac. Hs./Sem
MORAN KAREN DAIANA	Doctora por la UBA	EVALUACIÓN DE LA ESPERMATOGÉNESIS, MADURACIÓN ESPERMÁTICA Y FUNCIÓN TESTICULAR Y EPIDIDIMAL MEDIANTE LA ASOCIACIÓN DE HUELLAS DACTILARES DE ARNm ESPERMÁTICO Y TISULAR EN PADRILLOS	Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad de Buenos Aires	Julián Alberto BARTOLOMÉ	40 h

2.3.3. PERSONAL de APOYO:

Apellido y Nombre	Categoría (Adm., Lab., Campo, etc.)	Tiempo de Dedicac. Hs./Sem.

2.3.4. INVESTIGADORES en PLAN de TESIS:

Apellido y Nombre	Función	Título Proyecto de Tesis	Tiempo de Dedicac. Hs./Sem.



Corresponde a Resolución N° 403/2023

3. DURACIÓN ESTIMADA del PROYECTO:

3.1. FECHA de INICIO: 01-01-2024 FECHA DE FINALIZACIÓN: 31-12-2025

4. RESUMEN del PROYECTO: (Máximo 200 palabras)

Los caballos tienen una tasa de preñez baja por ciclo. Entender los mecanismos involucrados en la espermatogénesis y la maduración espermática permitirá desarrollar estrategias que mejoren la fertilidad. La espermatogénesis y la maduración espermática ocurren en el testículo y el epidídimo respectivamente y son procesos complejos regulados por múltiples genes. Una herramienta que puede ser clave en la comprensión de estos procesos fisiológicos es el análisis de los genes expresados diferencialmente (GED). El objetivo general de este trabajo es estudiar las bases moleculares de la contribución de cada tejido reproductivo en estos procesos. Por lo tanto, el objetivo específico es analizar *in silico* los GED en testículo y en las diferentes porciones de epidídimo equino. Para ello, se utilizarán las 4 bibliotecas, generadas mediante NGS (Illumina, Novogene, Durham NC USA), correspondientes a cada tejido (testículo, cabeza, cuerpo y cola de epidídimo). Se realizará el enriquecimiento de funciones mediante GO y KEGG. Se obtendrá una lista de GED y su función en la espermatogénesis y maduración espermática será analizada *in silico* en las bases de datos.

4.1 **Palabras claves:** RNA-Seq / Equino / Transcriptoma / Genes expresados diferencialmente

4.2 Abstract en inglés: (Máximo 200 palabras)

Horses have a low pregnancy rate per cycle. Understanding spermatogenesis and sperm maturation may lead to the development of strategies to improve fertility. Spermatogenesis and sperm maturation take place in the testis and epididymis, respectively. They are complex processes regulated by multiple genes. Studying differentially expressed genes (DEGs) could facilitate the understanding of these physiological processes. The main objective of this work is to study the molecular basis of the contribution of each reproductive tissue in these processes. Therefore, the specific objective is to analyze *in silico* the DEGs in the testis and different segments of the equine epididymis, including its different segments - head, body, and tail. For this, the four libraries (testis, head, body, and tail of the epididymis), previously generated by global transcriptomic analysis or RNA-Seq (Next Generation Sequencing, (Illumina, Novogene, Durham NC, USA), will be used. The enrichment of functions will be performed using GO and KEGG. A list of DEGs will be obtained, and their roles in spermatogenesis and sperm maturation will be analyzed *in silico* in the databases.

4.3. **Keywords:** RNA-Seq / Equine / Transcriptomic / Differentially expressed genes

5. INTRODUCCIÓN y ANTECEDENTES

5.1. Introducción

Los caballos tienen la tasa reproductiva más baja de todos los domésticos con un 43 % a un 60 % de tasa de preñez por ciclo (Das et al., 2013a). Esto se debe a que los reproductores, en la industria equina, se seleccionan en base a sus pedigríes, apariencia y destreza atlética, pero no por su potencial reproductivo (Terje Raudsepp, 2020). Por lo tanto, pequeñas mejoras en la fertilidad del padrillo tienen el potencial de aumentar significativamente la descendencia y, consecuentemente, el retorno económico para el criador.



Corresponde a Resolución N° 403/2023

Durante la maduración espermática en el epidídimo ocurren cambios bioquímicos, metabólicos y morfológicos. Estos consisten en alteraciones de la distribución de antígenos en la membrana acrosomal externa, disminución del contenido lipídico de la membrana citoplasmática y, como consecuencia, aumento de la rigidez (Kiyozumi, 2022). A su vez, la formación de puentes disulfuro en las protaminas, genera condensación nuclear (Cornwall, 2009; Griswold, 2016; Légaré et al., 2017; Neto et al., 2016; Sullivan & Mieusset, 2016). Estos cambios permiten que los espermatozoides adquieran motilidad progresiva y competencia para someterse a la capacitación y así fertilizar un ovocito. Dichos procesos están coordinados por la expresión diferencial de genes de forma secuencial (o diferidos en el tiempo si no son secuenciales) y tejido-específica. La expresión génica está altamente segmentada y regulada a lo largo del epidídimo, y la especificidad de funciones de sus diferentes segmentos ha sido facilitada por el análisis transcripcional (Belleannée et al., 2012; Légaré et al., 2017; Martínez et al., 2022; Sipilä & Björkgren, 2016; Wu et al., 2021; Yu et al., 2022)

El transcriptoma es la totalidad de ARN transcrito en la célula, que incluye el ARNm (Z. Wang et al., 2009) pero excluye el ARNr y el ARNt. El análisis de ARNm proporciona una visión directa de los genes transcripcionalmente activos en cada tejido lo que se denomina bibliotecas de expresión. Esta información es fundamental para una mejor interpretación del metabolismo celular. Su comprensión ayuda a determinar la influencia de factores ambientales y epigenéticos sobre genes en particular. Consistentemente, permite entender de qué manera los cambios en los perfiles transcripcionales afectan la salud (Manzoni et al., 2018).

A pesar de los avances en la transcriptómica, la aplicación de esta tecnología para evaluar ARNm en tejido testicular y epididimario equino son aún limitadas. Cientos de genes candidatos a modular la fertilidad masculina y femenina se han identificado utilizando diferentes modelos (Cheung et al., 2023; Gong et al., 2022; Jiang et al., 2022; Matzuk & Lamb, 2008; Werry et al., 2022; Xing et al., 2022). Sin embargo, la información disponible para otras especies, incluido el caballo, es limitada (Terje Raudsepp, 2020). Algunos estudios han demostrado expresión diferencial de muchos genes en individuos que manifestaron baja motilidad espermática, degeneración testicular inducida por tóxicos, e infertilidad (Dere et al., 2016; Feugang et al., 2010; Steger et al., 2008; Suliman et al., 2018; H. Wang et al., 2004). Se ha comprobado que el conjunto de ARNm testicular codifica para proteínas que participan en procesos como la transducción de señales, proliferación celular, fertilización y desarrollo embrionario. Mientras que los transcritos epididimarios codifican, principalmente, para proteínas involucradas en inmunidad, protección espermática y modificaciones de funciones celulares (Dean et al., 2008; Guyonnet et al., 2011; Légaré et al., 2017; Swegen et al., 2015). Esto confirma un papel importante del epidídimo en la protección del tracto genital contra infecciones ascendentes y en la inducción de cambios espermáticos asociados con la adquisición de capacidad de fertilización (Dean et al., 2008; Guyonnet et al., 2011; Légaré et al., 2017).

En la rata, de la totalidad de genes que codifican para proteínas de membrana espermática, el 31 % fue expresado únicamente en el epidídimo, el 24 % únicamente en el testículo, y el 26 % de los genes se expresaron en ambos tejidos. Este patrón sugiere que una gran fracción de proteínas de membrana espermática deriva del epidídimo (Dean et al., 2008). En bovinos, se identificaron diferencias en expresiones génicas en toros Holando subfértiles a partir de muestras de tejido epididimario (Légaré et al., 2017). También se ha caracterizado el transcriptoma e identificado genes sobre-expresados y sub-expresados en razas cebús y cruzas a partir de tejido testicular (Elango et al., 2020). Además, genes involucrados en funciones espermáticas y fertilización fueron estudiados en *Bos indicus* y en *Bos taurus* a partir de eyaculados (Raval et al., 2019; Selvaraju et al., 2017).

En el caso de cerdos, se ha estudiado el transcriptoma espermático y se han observado transcritos fragmentados que afectan a determinados genes más que otros, probablemente de manera selectiva (Gòdia et al., 2019). De hecho, se compararon micro-ARN entre eyaculados de alta y baja fertilidad, donde los genes blancos estaban involucrados en fertilidad, supervivencia espermática, tolerancia a la inmunidad



Corresponde a Resolución N° 403/2023

o regulación del ciclo celular (Martinez et al., 2022). En el carnero se describió el transcriptoma del epidídimo y se identificaron micro-ARN (Wu et al., 2021). En burro se comparó el transcriptoma de testículo con el de epidídimo y se caracterizaron genes específicos de testículo que tuvieron que ver con la formación de flagelo espermático, meiosis, movimiento y ensamble ciliar. Mientras que los específicos de epidídimo estuvieron asociados al desarrollo de gónadas (Yu et al., 2022). En un estudio en equinos, el 97 % de los transcritos espermáticos fueron compartidos con testículos. Además, se hallaron 165 transcritos espermáticos que no se encontraron en tejido testicular (Das et al., 2013a). Estos autores no estudiaron la contribución del epidídimo a los transcritos espermáticos.

Durante el paso de los espermatozoides por el epidídimo ocurren numerosos procesos e intercambios (James et al., 2020). Algunos hallazgos sugieren que hay un metabolismo activo de ácidos grasos poliinsaturados durante la espermatogénesis y la maduración espermática en el epidídimo (Gautier et al., 2020). Incluso se demostró que los epididimosomas, además de transportar proteínas, transfieren a los espermatozoides micro-ARN que regularían vías importantes para la motilidad, la viabilidad celular y el desarrollo embrionario (Twenter et al., 2020a). Los micro-ARN son ARN no codificantes que tienen la capacidad de silenciar genes a través de la inhibición en la traducción o de la degradación del ARNm blanco (Twenter et al., 2020b). Esta información es muy importante ya que la cantidad de ARN en el espermatozoide es muy baja y varía según las distintas especies (Vijayalakshmy et al., 2018). En el caso del equino es de 20 fg/espermatozoide (Das et al., 2013a). Por lo tanto, caracterizar los tejidos reproductivos a nivel molecular, aportaría información clave para estudios de fertilidad.

5.2. RESULTADOS ALCANZADOS POR el(los) INTEGRANTE(S) del PROYECTO DENTRO del ÁREA de CONOCIMIENTO del MISMO: (Publicados, enviados o aceptados para publicar, o inéditos)

Presentaciones a congresos:

- 1) TRANSCRIPTOMIC PROFILES REVEAL DIFFERENCES IN GENE EXPRESSION BETWEEN THE TESTES AND EPIDIDYMIS IN STALLIONS. Moran, KD; Bilbao, MG; Bartolomé, JA; Ferrer, MS. XII International Symposium on Equine Reproduction. 10 – 14 de julio de 2023. Foz do Iguaçu, Brazil. Modalidad presencial.
- 2) EXPRESSION OF GENES ASSOCIATED WITH SPERM-OOCYTE INTERACTION IN THE STALLION REPRODUCTIVE TRACT. Xavier PMBBS, Moran K.D., Ellerbrock R.E., Palomares-Naveda R.A., Cortes-Beltran D., Gomes D.M.L., Ferrer M.S. XII International Symposium on Equine Reproduction. 10 – 14 de julio de 2023. Foz do Iguaçu, Brazil. Modalidad presencial.
- 3) CARACTERIZACIÓN DEL TRANSCRIPTOMA TESTICULAR Y EPIDIDIMARIO EQUINO. Morán, KD; Bilbao, MG; Bartolomé, JA; Ferrer, MS. XXIII Jornada Anual de la Sociedad Argentina de Biología. Sociedad Argentina de Biología. Buenos Aires, Argentina. 1 – 3 de diciembre de 2021. Modalidad virtual
- 4) EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE GENES EN TEJIDO TESTICULAR Y EPIDIDIMARIO EQUINO. Morán, KD; Bilbao, MG; Bartolomé, JA; Ferrer, MS. XXIII Jornada Anual de la Sociedad Argentina de Biología. Sociedad Argentina de Biología. Buenos Aires, Argentina. 1 – 3 de diciembre de 2021. Modalidad virtual.
- 5) EXTRACCIÓN DE ARN DE TEJIDO TESTICULAR Y EPIDIDIMARIO PARA EL ANÁLISIS DEL TRANSCRIPTOMA EN PADRILLO. Morán, KD; Bilbao, MG; Bartolomé, JA; Ferrer, MS. X Jornada de Jóvenes Investigadores del INITRA. Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad de Buenos Aires (FCV-UBA). Buenos Aires, Argentina. 3 y 4 de junio de 2021. Modalidad Virtual

Publicaciones en revistas internacionales:

- 1) TRANSCRIPTOMIC PROFILES REVEAL DIFFERENCES IN GENE EXPRESSION BETWEEN THE TESTES AND EPIDIDYMIS IN STALLIONS. Moran K.D., Bilbao M.G., Bartolomé J.A., Ferrer M.S. JOURNAL OF EQUINE VETERINARY SCIENCE. Vol. 125, 2023, 104603. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2023.104603>.



Corresponde a Resolución N° 403/2023

- 2) EXPRESSION OF GENES ASSOCIATED WITH SPERM-OOCYTE INTERACTION IN THE STALLION REPRODUCTIVE TRACT. Xavier PMBBS, Moran K.D., Ellerbrock R.E., Palomares-Naveda R.A., Cortes-Beltran D., Gomes D.M.L., Ferrer M.S. JOURNAL OF EQUINE VETERINARY SCIENCE. Vol. 125, 2023, 104626. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2023.104626>.
- 3) CHARACTERIZATION OF EQUINE TESTICULAR AND EPIDIDIMARY TRANSCRIPTOME. Moran K.D., Bilbao M.G., Bartolomé J.A., Ferrer M.S. BIOCELL Vol. 46, Suppl. 4, 2022. ISSN 0327- 9545. ISSN 1667-5746 (online version).
- 4) DIFFERENTIAL EXPRESSED GENES ON EQUINE TESTICULAR AND EPIDIDIMARY TISSUE. Moran K.D., Bilbao M.G., Bartolomé JA, Ferrer M.S. BIOCELL Vol. 46, Suppl. 4, 2022. ISSN 0327- 9545. ISSN 1667-5746 (online versión).

5.3. TRABAJOS de INVESTIGACIÓN de los INTEGRANTES del EQUIPO, EN ESTA U OTRA INSTITUCIÓN, RELACIONADOS al PROYECTO:

Proyecto: DEFINING EQUINE SPERM'S LIFE HISTORY AND ASSESSING TESTICULAR AND EPIDIDYMAL FUNCTION THROUGH SPERM MRNA FINGERPRINTS.

Entidad evaluadora/otorgante: University of Georgia Competitive Intramural Equine Programs Research Initiative Proposals, Athens, GA.

Integrantes: Ferrer MS, Palomares RA, Ellerbrock R, Bartolomé JA, Moran KD, Bilbao MG

6. DESCRIPCIÓN del PROYECTO

6.1. PROBLEMA CIENTÍFICO, OBJETIVOS, HIPÓTESIS y RESULTADOS ESPERADOS del PROYECTO

Problema:

Los grandes avances en las tecnologías de secuenciación del ADN posibilitaron secuenciar ADNc a partir del ARN extraído de las células. Este proceso se denomina secuenciación global del ARN, abreviado como RNA-Seq, y revela la presencia y la cantidad de ARN en una muestra biológica en un determinado momento. Esta técnica permite definir un mapa preciso de todas las isoformas alternativas que se presentan en los diferentes tipos celulares, así como analizar perturbaciones y diferentes estados transcripcionales. La información proveniente de RNA-Seq es muy compleja y abundante y las herramientas bioinformáticas desarrolladas en los últimos años son múltiples, e intentan responder a las diferentes preguntas biológicas (Garber et al., 2011; Long, 2020; Z. Wang et al., 2009).

Desde la secuenciación del primer genoma equino (Wade et al., 2009), el progreso de la genómica en esta especie ha tenido logros sobresalientes en casi todos los campos. Estos incluyeron el descubrimiento de mutaciones causantes de trastornos y enfermedades (T. Raudsepp et al., 2019). Sin embargo, en comparación con otros rasgos complejos, la genómica de los equinos en la reproducción ha recibido relativamente menos atención, a pesar de que el desempeño reproductivo es de alta importancia económica (Metzger et al., 2015; Terje Raudsepp, 2020; Raudsepp et al., 2013). El uso de herramientas tecnológicas disponibles para el estudio de la transcriptómica tisular en padrillos puede generar información valiosa sobre la función testicular y epididimaria. Esto ayudaría a elucidar mecanismos involucrados en problemas de fertilidad. Dicha información es necesaria para desarrollar tratamientos eficientes dirigidos a modificaciones específicas, según el origen. Este plan intentará generar bases teóricas que aporten a futuros trabajos sobre problemas de fertilidad en padrillos.

Objetivos: Estudiar la expresión génica de los diferentes tejidos reproductivos involucrados en la espermatogénesis y maduración espermática.



Corresponde a Resolución N° 403/2023

Objetivos Particulares:

- 1- Construir bibliotecas de expresión a partir de porciones de cada tejido reproductivo (testículo, cabeza, cuerpo y cola de epidídimo) obtenidas ex vivo.
- 2- Analizar las diferencias entre bibliotecas de expresión de cada tejido reproductivo (testículo, cabeza, cuerpo y cola de epidídimo) *in silico*.

Hipótesis:

En padrillos reproductivamente normales la expresión génica es diferente entre el testículo y las distintas porciones del epidídimo.

Resultados:

Se espera obtener una lista de genes expresados diferencialmente que permita caracterizar el tejido testicular y las tres porciones de epidídimo. A través de la determinación de estas “huellas dactilares” de ARNm tisular esperamos obtener información sobre: 1) el origen de cada transcripto, lo que permitiría identificar marcadores de espermatogénesis y maduración espermática; 2) la contribución de los testículos y de las diferentes secciones del sistema de conductos en la maduración espermática y en la adquisición de la habilidad fertilizante de los espermatozoides en base a la actividad transcripcional y expresión génica diferencial; 3) Las vías enriquecidas en cada tejido y el patrón de expresión génica a lo largo del tracto reproductor del padrillo. Este estudio proveerá la información para generar una biblioteca génica completa asociada a la espermatogénesis y maduración espermática. En el futuro, podría permitir determinar disfunción testicular o epididimal, y ayudar a dilucidar los mecanismos subyacentes a la infertilidad en padrillos.

6.2. METODOLOGÍA, MODELOS y TÉCNICAS

Datos iniciales:

A partir de las 4 bibliotecas correspondientes a cada tejido (testículo, cabeza, cuerpo y cola de epidídimo) generadas mediante NGS (Illumina, Novogene, Durham NC USA) se procederá al análisis de los GED.

Análisis de expresión diferencial

La secuenciación global del ARN se realizará mapeando y contando la distribución de las lecturas de acuerdo a la anotación del genoma equino. Estas lecturas se ordenarán sobre los genes y los transcritos de dicho genoma. Primero, todas las secuencias de genes serán extraídas del genoma de referencia e indexadas. Luego, los transcritos anotados serán extraídos también, incluso las variantes de corte y empalme que sean extraídas de manera independiente. Posteriormente, todas las lecturas generadas por la secuenciación serán mapeadas sobre todos los transcritos (además de ser mapeados sobre todo el gen). De este proceso, las lecturas serán categorizadas y asignadas a determinados genes, y así se determinarán los valores de expresión de cada gen y de cada transcripto calculando el número de lecturas que es asignado a cada sitio específico.

El análisis de expresión diferencial entre dos condiciones / grupos (dos réplicas biológicas por condición) se realizará por medio del paquete de R DESeq2 1.14.1 (DESeq2 with biological replicates). DESeq permite determinar, estadísticamente, la expresión diferencial en datos de expresión génica digital, estimando que los recuentos de cada lectura siguen una distribución binomial negativa. Los valores-p resultantes se ajustarán usando el método de Benjamini y Hochberg para controlar la tasa de descubrimientos falsos (FDR, por sus siglas en inglés). Los genes con un valor-p ajustado $< 0,05$ encontrados por DESeq2 se considerarán como expresados diferencialmente (Anders & Huber, 2010).

Antes del análisis de expresión génica diferencial, para cada biblioteca de secuenciación, la cantidad de lecturas se ajustará con el paquete de R EdgeR (Robinson et al., 2009) a través de un factor normalizado de escala (For EdgeR without biological replicates). El análisis de expresión diferencial de dos condiciones se realizará con el paquete de R EdgeR 3.16.5. Los valores-p resultantes se ajustarán usando el método



Corresponde a Resolución N° 403/2023

de Benjamini y Hochberg. Los límites serán, para la expresión diferencial significativa, el valor-p corregido de 0,05 y la tasa de veces de cambio (Fold Change, FC) como valor absoluto de 1.

Los resultados se expresarán a través de gráficos de Volcán, que grafican la relación entre los valores-p del análisis estadístico y la diferencia de los valores de expresión de las muestras entre grupos, representada por FC. Para normalizar los datos, se aplica el logaritmo en base 2 (\log_2) de FC y el logaritmo en base 10 (\log_{10}) del valor-p con signo invertido. El \log_2 (FC) se grafica sobre el eje de las abscisas, mientras que el $-\log_{10}$ (valor-p) se encuentra sobre el eje de la ordenada. Mientras más extremos sean los valores de diferencia de expresión para cada gen, más alejados del 0 se encontrarán los puntos en el eje de las abscisas. Cuanto menor es el valor-p mayor es la diferencia de significancia para cada gen. Por lo tanto, en el gráfico, mayor será el $-\log_{10}$ (valor-p). Los valores más alejados del eje principal (sobre los vértices superiores del gráfico) corresponden a los genes estadísticamente significativos, ya que representan los valores menores del valor-p y grandes cambios en su diferencia de expresión.

Análisis de corte y empalme alternativo y predicción de transcritos nuevos

Se utilizará el método de ensamblaje Cufflinks v2.1.1 Reference Annotation Based Transcript (RABT) para construir e identificar transcritos conocidos y nuevos a partir de los resultados de alineamiento.

6.3. CONTRIBUCIÓN al CONOCIMIENTO CIENTÍFICO y/o TECNOLÓGICO y a la RESOLUCIÓN de los PROBLEMAS

Reportes previos han caracterizado el transcriptoma de testículos de padrillos utilizando diferentes técnicas (Coleman et al., 2010; Das et al., 2013b). RNA-Seq permite capturar casi todas las transcripciones expresadas en un momento determinado, mientras que los micro-arreglos no permiten detectar variantes de corte y empalme, genes y transcritos nuevos (Chen et al., 2011; Z. Wang et al., 2009). Perfiles de expresión génica diferencial entre las diferentes porciones anatómicas del tracto reproductivo fueron estudiados en las distintas especies (Elango et al., 2020; Huang et al., 2022; Jervis & Robaire, 2001; Wu et al., 2021; Yu et al., 2022). De hecho, marcadores de envejecimiento de cada porción del epidídimo fueron identificados en ratón (Huang et al., 2022). Esta información podría servir para evaluar el funcionamiento de este órgano, ya que las proteínas producidas por el epidídimo juegan un rol muy importante en generar el ambiente luminal, necesario para la maduración espermática (Cornwall, 2009). Algunas de ellas son secretadas desde el epitelio epididimario hacia el lumen, afectando la superficie de los espermatozoides (Gatti et al., 2004), incluso volviéndose proteínas integrales de la membrana espermática (Sostaric et al., 2008). Entre los últimos estudios realizados en equinos, se identificaron micro-ARN presentes en espermatozoides de cola de epidídimo que no estuvieron en espermatozoides de cabeza, de los cuales algunos se detectaron en el epitelio epididimario y otros, en epididimosomas. Esto sugiere que esos micro-ARN se adquieren durante la migración de los espermatozoides por el epidídimo (Twenter et al., 2020). Además, se ha comprobado que espermatozoides de cabeza y cuerpo no desencadenan la reacción acrosómica ante estímulos de progesterona o calcio. Mientras que una pequeña porción de espermatozoides recuperados de cola sí responde a estos estímulos. La explicación a esto tendría que ver con la síntesis/adquisición de los receptores específicos (Sostaric et al., 2008). El gen FPKB6 (y sus polimorfismos) está relacionado con la falla en la reacción acrosómica y es un posible candidato como marcador de sub-fertilidad masculina en mamíferos (Terje Raudsepp et al., 2012; Schrimpf et al., 2015). De hecho, la detección de estas mutaciones, son la única prueba genética disponible para la sub-fertilidad de los padrillos (Terje Raudsepp, 2020).

En base a nuestro conocimiento, hasta el momento no se cuenta con bibliografía que reporte datos del transcriptoma de las diferentes porciones del epidídimo en padrillo. Por lo tanto, este trabajo será novedoso al estudiar transcritos epididimarios del equino, además de los testiculares. El posterior análisis de los perfiles genómicos y las vías sobre o sub-reguladas aportará más información molecular sobre la espermatogénesis y la maduración espermática. Esta información es clave para futuros estudios que



Corresponde a Resolución N° 403/2023

analicen estos cambios y cómo influyen en dichos procesos y, por lo tanto, en la fertilización y en la embriogénesis.

6.4. CRONOGRAMA ANUAL de ACTIVIDADES

Actividades	Año 1: Meses											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Revisión bibliográfica	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Entrenamiento y capacitación en manejo de bases de datos genómicos	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Análisis <i>in silico</i>	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Revisión bibliográfica	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Actividades	Año 2: Meses											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Revisión bibliográfica	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Entrenamiento y capacitación en manejo de bases de datos genómicos.	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Análisis <i>in silico</i>	X	X	X	X	X	X	X					
Publicación de resultados								X	X	X	X	X
Redacción de tesis								X	X	X	X	X

7. INFRAESTRUCTURA y PRESUPUESTO

7.1. INFRAESTRUCTURA, EQUIPAMIENTO, SERVICIOS y OTROS BIENES REQUERIDOS por el PROYECTO YA EXISTENTES en esta INSTITUCIÓN:

En análisis *in silico*, la revisión bibliográfica y la redacción de tesis se realizarán se llevarán a cabo en Laboratorio de Reproducción (FCV-UNLPam) y en el Centro de Investigación y Desarrollo de Fármacos (CIDEF), localizado en el mismo predio de la FCV-UNLPam, a cargo de la Dra. María Guillermina Bilbao y del Dr. Julián Alberto Bartolomé. Las instalaciones de ambos sitios son las adecuadas para el desarrollo de tareas de investigación, con espacio físico suficiente para albergar a un grupo de trabajo: áreas de escritorio con computadoras e impresoras, y áreas de laboratorios en completo funcionamiento.

7.2. INFRAESTRUCTURA, EQUIPAMIENTO, SERVICIOS y OTROS BIENES NECESARIOS para el PROYECTO y NO DISPONIBLES en esta FACULTAD

Para llevar adelante las tareas propuestas en este proyecto no se necesita equipamiento, servicios u otros bienes NO DISPONIBLES en esta facultad.

7.3. JUSTIFICACIÓN de la ADQUISICIÓN o FACTIBILIDAD de ACCESO en CONDICIONES de PRESTAMO o USO de los BIENES NO EXISTENTES en esta INSTITUCIÓN

Para llevar adelante las actividades propuestas en este proyecto NO SE REQUIERE de la adquisición o factibilidad de acceso en condiciones de préstamo o uso de los bienes no existentes en esta institución.



Corresponde a Resolución N° 403/2023

7.4. ESPECIFICAR otras FUENTES de FINANCIACIÓN

El ensayo de RNA-Seq y el análisis bioinformático (NOVOGENE) fue solventado por el proyecto:
DEFINING EQUINE SPERM'S LIFE HISTORY AND ASSESSING TESTICULAR AND EPIDIDYMAL FUNCTION THROUGH SPERM MRNA FINGERPRINTS.

Entidad evaluadora/otorgante: University of Georgia Competitive Intramural Equine Programs Research Initiative Proposals, Athens, GA.

Integrantes: Ferrer MS, Palomares RA, Ellerbrock R, Bartolome JA, Moran KD, Bilbao MG

Además, la tesista Karen D Moran cuenta con una Beca Interna Doctoral de CONICET 2019-2025 (RESOL-2018-2704-APN-DIR#CONICET).

7.5. PRESUPUESTO ESTIMADO para el PROYECTO PRESENTADO (Total y Anual)

Viajes: pasajes para pasantías en el exterior..... \$ 440.000
Otros: viáticos para pasantía en el exterior.....\$ 825.000
Total..... \$ 1.265.000

* El Consejo Directivo adjudicará presupuesto a cada Proyecto de acuerdo a su Presupuesto de Ciencia y Técnica anual, tomando en cuenta normas y criterios que el mismo determine.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Anders, S., & Huber, W. (2010). Differential expression analysis for sequence count data. *Genome Biology*, 11(10), R106. <https://doi.org/10.1186/gb-2010-11-10-r106>
- Belleannée, C., Thimon, V., & Sullivan, R. (2012). Region-specific gene expression in the epididymis. *Cell and Tissue Research*, 349(3), 717–731. <https://doi.org/10.1007/s00441-012-1381-0>
- Chen, G., Wang, C., & Shi, T. L. (2011). Overview of available methods for diverse RNA-Seq data analyses. In *Science China Life Sciences* (Vol. 54, Issue 12, pp. 1121–1128). <https://doi.org/10.1007/s11427-011-4255-x>
- Cheung, S., Xie, P., Rosenwaks, Z., & Palermo, G. D. (2023). Profiling the male germline genome to unravel its reproductive potential. *Fertility and Sterility*, 119(2), 196–206. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2022.11.006>
- Coleman, S. J., Zeng, Z., Wang, K., Luo, S., Khrebtukova, I., Mienaltowski, M. J., Schroth, G. P., Liu, J., & MacLeod, J. N. (2010). Structural annotation of equine protein-coding genes determined by mRNA sequencing. *Animal Genetics*, 41(SUPPL. 2), 121–130. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2052.2010.02118.x>
- Cornwall, G. A. (2009). New insights into epididymal biology and function. *Human Reproduction Update*, 15(2), 213–227. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmn055>
- Das, P. J., McCarthy, F., Vishnoi, M., Paria, N., Gresham, C., Li, G., Kachroo, P., Sudderth, A. K., Teague, S., Love, C. C., Varner, D. D., Chowdhary, B. P., & Raudsepp, T. (2013a). Stallion Sperm Transcriptome Comprises Functionally Coherent Coding and Regulatory RNAs as Revealed by Microarray Analysis and RNA-seq. *PLoS ONE*, 8(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0056535>
- Das, P. J., McCarthy, F., Vishnoi, M., Paria, N., Gresham, C., Li, G., Kachroo, P., Sudderth, A. K., Teague, S., Love, C. C., Varner, D. D., Chowdhary, B. P., & Raudsepp, T. (2013b). Stallion Sperm Transcriptome Comprises Functionally Coherent Coding and Regulatory RNAs as Revealed by Microarray Analysis and RNA-seq. *PLoS ONE*, 8(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0056535>
- Dean, M. D., Good, J. M., & Nachman, M. W. (2008). Adaptive evolution of proteins secreted during

Corresponde a Resolución N° 403/2023

sperm maturation: An analysis of the mouse epididymal transcriptome. *Molecular Biology and Evolution*, 25(2), 383–392. <https://doi.org/10.1093/molbev/msm265>

- Dere, E., Wilson, S. K., Anderson, L. M., & Boekelheide, K. (2016). Sperm molecular biomarkers are sensitive indicators of testicular injury following subchronic model toxicant exposure. *Toxicological Sciences*, 153(2), 327–340. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfw137>
- Elango, K., Kumaresan, A., Sharma, A., Nag, P., Prakash, M. A., Sinha, M. K., Manimaran, A., Peter, E. S. K. J., Jeyakumar, S., Selvaraju, S., Ramesha, K. P., & Datta, T. K. (2020). Sub-fertility in crossbred bulls: Deciphering testicular level transcriptomic alterations between zebu (*Bos indicus*) and crossbred (*Bos taurus* x *Bos indicus*) bulls. *BMC Genomics*, 21(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/s12864-020-06907-1>
- Feugang, J. M., Rodriguez-Osorio, N., Kaya, A., Wang, H., Page, G., Ostermeier, G. C., Topper, E. K., & Memili, E. (2010). Transcriptome analysis of bull spermatozoa: Implications for male fertility. *Reproductive BioMedicine Online*, 21(3), 312–324. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2010.06.022>
- Garber, M., Grabherr, M. G., Guttman, M., & Trapnell, C. (2011). Nature Methods Computational methods for transcriptome annotation and quantification using RNA-seq 1 . Similar memory usage was required for the alignment to the rat transcriptome. 2. Raised gap extend and minimum mismatch parameters to increase sensiti. *Nature Publishing Group*, 8(6), 469–477. <http://dx.doi.org/10.1038/nmeth.1613>.
- Gatti, J. L., Castella, S., Dacheux, F., Ecroyd, H., Métayer, S., Thimon, V., & Dacheux, J. L. (2004). Post-testicular sperm environment and fertility. *Animal Reproduction Science*, 82–83, 321–339. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2004.05.011>.
- Gautier, C., Scarlet, D., Ertl, R., Walter, I., Wulf, M., Nagel, C., Aurich, J., & Aurich, C. (2020). Expression of enzymes involved in polyunsaturated fatty acid synthesis in the stallion testis and epididymis. *Reproduction, Fertility and Development*, 32(9), 851. <https://doi.org/10.1071/RD19342>.
- Gòdia, M., Estill, M., Castelló, A., Balasch, S., Rodríguez-Gil, J. E., Krawetz, S. A., Sánchez, A., & Clop, A. (2019). A RNA-seq analysis to describe the boar sperm transcriptome and its seasonal changes. *Frontiers in Genetics*, 10(MAR), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fgene.2019.00299>.
- Gong, J., Wang, P., Liu, J. C., Li, J., Zeng, Q. X., Yang, C., Li, Y., Yu, D., Cao, D., & Duan, Y. G. (2022). Integrative Analysis of Small RNA and mRNA Expression Profiles Identifies Signatures Associated With Chronic Epididymitis. *Frontiers in Immunology*, 13(May), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.883803>
- Griswold, M. D. (2016). Spermatogenesis: The commitment to Meiosis. *Physiological Reviews*, 96(1), 1–17. <https://doi.org/10.1152/physrev.00013.2015>.
- Guyonnet, B., Dacheux, F., Dacheux, J. L., & Gatti, J. L. (2011). The epididymal transcriptome and proteome provide some insights into new epididymal regulations. *Journal of Andrology*, 32(6), 651–664. <https://doi.org/10.2164/jandrol.111.013086>.
- Hosseini, A., & Khalili, M. A. (2017). Improvement of motility after culture of testicular spermatozoa: The effects of incubation timing and temperature. *Translational Andrology and Urology*, 6(2), 271–276. <https://doi.org/10.21037/tau.2017.03.43>.
- Huang, Y., Li, X., Sun, X., Yao, J., Gao, F., Wang, Z., Hu, J., Wang, Z., Ouyang, B., Tu, X., Zou, X., Liu, W., Lu, M., Deng, C., Yang, Q., & Xie, Y. (2022). Anatomical Transcriptome Atlas of the Male Mouse

Corresponde a Resolución N° 403/2023

Reproductive System During Aging. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.782824>.

- James, E. R., Carrell, D. T., Aston, K. I., Jenkins, T. G., Yeste, M., & Salas-Huetos, A. (2020). The role of the epididymis and the contribution of epididymosomes to mammalian reproduction. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(15), 1–17. <https://doi.org/10.3390/ijms21155377>.
- Jervis, K. M., & Robaire, B. (2001). Dynamic Changes in Gene Expression along the Rat Epididymis 1. In *BIOLOGY OF REPRODUCTION* (Vol. 65). <http://www.biolreprod.org>.
- Jiang, J., Xu, P., Zhang, J., Li, Y., Zhou, X., Jiang, M., Zhu, J., Wang, W., & Yang, L. (2022). Global transcriptome analysis reveals potential genes associated with genic male sterility of rapeseed (*Brassica napus* L.). *Frontiers in Plant Science*, 13(October), 1–21. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.1004781>.
- Kim, D., Langmead, B., & Salzberg, S. L. (2015). HISAT: a fast spliced aligner with low memory requirements Daehwan HHS Public Access. *Nature Methods*, 12(4), 357–360. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3317.HISAT>.
- Kiyozumi, D. (2022). The molecular mechanisms of mammalian sperm maturation regulated by NELL2-ROS1 lumicrine signaling. *Journal of Biochemistry*, 172(6), 341–346. <https://doi.org/10.1093/jb/mvac071>
- Légaré, C., Akintayo, A., Blondin, P., Calvo, E., & Sullivan, R. (2017). Impact of male fertility status on the transcriptome of the bovine epididymis. *Molecular Human Reproduction*, 23(6), 355–369. <https://doi.org/10.1093/molehr/gax019>.
- Liao, Y., Smyth, G. K., & Shi, W. (2014). FeatureCounts: An efficient general-purpose program for assigning sequence reads to genomic features. *Bioinformatics*, 30(7), 923–930. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt656>.
- Long, J. A. (2020). The 'omics' revolution: Use of genomic, transcriptomic, proteomic and metabolomic tools to predict male reproductive traits that impact fertility in livestock and poultry. *Animal Reproduction Science*, 220(January), 106354. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2020.106354>.
- Manzoni, C., Kia, D. A., Vandrovcova, J., Hardy, J., Wood, N. W., Lewis, P. A., & Ferrari, R. (2018). Genome, transcriptome and proteome: The rise of omics data and their integration in biomedical sciences. *Briefings in Bioinformatics*, 19(2), 286–302. <https://doi.org/10.1093/BIB/BBW114>.
- Martínez, C. A., Roca, J., Alvarez-rodriguez, M., & Rodriguez-martinez, H. (2022). miRNA-Profilig in Ejaculated and Epididymal Pig Spermatozoa and Their Relation to Fertility after Artificial Insemination. *Biology*, 11(2), 1–19. <https://doi.org/10.3390/biology11020236>.
- Matzuk, M. M., & Lamb, D. J. (2008). The biology of infertility: Research advances and clinical challenges. *Nature Medicine*, 14(11), 1197–1213. <https://doi.org/10.1038/nm.f.1895>.
- Metzger, J., Karwath, M., Tonda, R., Beltran, S., Águeda, L., Gut, M., Gut, I. G., & Distl, O. (2015). Runs of homozygosity reveal signatures of positive selection for reproduction traits in breed and non-breed horses. *BMC Genomics*, 16(1). <https://doi.org/10.1186/s12864-015-1977-3>.
- Neto, F. T. L., Bach, P. V., Najari, B. B., Li, P. S., & Goldstein, M. (2016). Spermatogenesis in humans and its affecting factors. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 59, 10–26. <https://doi.org/10.1016/j.semcd.2016.04.009>.
- Raudsepp, T., Finno, C. J., Bellone, R. R., & Petersen, J. L. (2019). Ten years of the horse reference genome: insights into equine biology, domestication and population dynamics in the post-genome era. In *Animal Genetics* (Vol. 50, Issue 6, pp. 569–597). Blackwell Publishing Ltd.

Corresponde a Resolución N° 403/2023

<https://doi.org/10.1111/age.12857>.

- Raudsepp, Terje. (2020). Genetics of Equine Reproductive Diseases. *Veterinary Clinics of North America - Equine Practice*, 36(2), 395–409. <https://doi.org/10.1016/j.cveq.2020.03.013>.
- Raudsepp, Terje, McCue, M. E., Das, P. J., Dobson, L., Vishnoi, M., Fritz, K. L., Schaefer, R., Rendahl, A. K., Derr, J. N., Love, C. C., Varner, D. D., & Chowdhary, B. P. (2012). Genome-Wide Association Study Implicates Testis-Sperm Specific FKBP6 as a Susceptibility Locus for Impaired Acrosome Reaction in Stallions. *PLoS Genetics*, 8(12). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003139>.
- Raval, N. P., Shah, T. M., George, L. B., & Joshi, C. G. (2019). Insight into bovine (*Bos indicus*) spermatozoal whole transcriptome profile. *Theriogenology*, 129, 8–13. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.01.037>.
- Robinson, M. D., McCarthy, D. J., & Smyth, G. K. (2009). edgeR: A Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics*, 26(1), 139–140. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp616>.
- Schrimpf, R., Metzger, J., Martinsson, G., Sieme, H., & Distl, O. (2015). Implication of FKBP6 for Male Fertility in Horses. *Reproduction in Domestic Animals*, 50(2), 195–199. <https://doi.org/10.1111/rda.12467>.
- Selvaraju, S., Parthipan, S., Somashekar, L., Kolte, A. P., Krishnan Binsila, B., Arangasamy, A., & Ravindra, J. P. (2017). Occurrence and functional significance of the transcriptome in bovine (*Bos taurus*) spermatozoa. *Scientific Reports*, 7. <https://doi.org/10.1038/srep42392>.
- Sipilä, P., & Björkgren, I. (2016). Segment-specific regulation of epididymal gene expression. *Reproduction*, 152(3), R91–R99. <https://doi.org/10.1530/REP-15-0533>.
- Sostaric, E., Aalberts, M., Gadella, B. M., & Stout, T. A. E. (2008). The roles of the epididymis and prostasomes in the attainment of fertilizing capacity by stallion sperm. *Animal Reproduction Science*, 107(3–4), 237–248. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2008.04.011>.
- Steger, K., Wilhelm, J., Konrad, L., Stalf, T., Greb, R., Diemer, T., Kliesch, S., Bergmann, M., & Weidner, W. (2008). Both protamine-1 to protamine-2 mRNA ratio and Bcl2 mRNA content in testicular spermatids and ejaculated spermatozoa discriminate between fertile and infertile men. *Human Reproduction*, 23(1), 11–16. <https://doi.org/10.1093/humrep/dem363>.
- Suliman, Y., Becker, F., & Wimmers, K. (2018). Implication of transcriptome profiling of spermatozoa for stallion fertility. *Reproduction, Fertility and Development*, 30(8), 1087–1098. <https://doi.org/10.1071/RD17188>.
- Sullivan, R., & Miesusset, R. (2016). The human epididymis: Its function in sperm maturation. *Human Reproduction Update*, 22(5), 574–587. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmw015>.
- Swegen, A., Curry, B. J., Gibb, Z., Lambourne, S. R., Smith, N. D., & Aitken, R. J. (2015). Investigation of the stallion sperm proteome by mass spectrometry. *Reproduction*, 149(3), 235–244. <https://doi.org/10.1530/REP-14-0500>.
- Trapnell, C., Williams, B. A., Pertea, G., Mortazavi, A., Kwan, G., Baren, M. J. Van, Salzberg, S. L., Wold, B. J., & Pachter, L. (2010). *letters Transcript assembly and quantification by RNA-Seq reveals unannotated transcripts and isoform switching during cell differentiation*. 28(5). <https://doi.org/10.1038/nbt.1621>.
- Twenter, H., Klohonatz, K., Davis, K., Bass, L., Coleman, S. J., Bouma, G. J., & Bruemmer, J. E.

Corresponde a Resolución N° 403/2023

- (2020a). Transfer of MicroRNAs From Epididymal Epithelium to Equine Spermatozoa. *Journal of Equine Veterinary Science*, 87, 102841. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2019.102841>.
- Twenter, H., Klohonatz, K., Davis, K., Bass, L., Coleman, S. J., Bouma, G. J., & Bruemmer, J. E. (2020b). Transfer of MicroRNAs From Epididymal Epithelium to Equine Spermatozoa. *Journal of Equine Veterinary Science*, 87. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2019.102841>.
 - Vijayalakshmy, K., Kumar, D., Virmani, M., Jacob, N., & Kumar, P. (2018). Sperm Transcriptomics: An Emerging Technique to Assess Male Fertility. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 7(09), 1188–1200. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2018.709.141>.
 - Wade, C. M., Giulotto, E., Sigurdsson, S., Zoli, M., Gnerre, S., Imsland, F., Lear, T. L., Adelson, D. L., Bailey, E., Bellone, R. R., Blöcker, H., Distl, O., Edgar, R. C., Garber, M., Leeb, T., Mauceli, E., MacLeod, J. N., Penedo, M. C. T., Raison, J. M., ... Lindblad-Toh, K. (2009). Genome sequence, comparative analysis, and population genetics of the domestic horse. *Science*, 326(5954), 865–867. <https://doi.org/10.1126/science.1178158>.
 - Wang, H., Zhou, Z., Xu, M., Li, J., Xiao, J., Xu, Z. Y., & Sha, J. (2004). A spermatogenesis-related gene expression profile in human spermatozoa and its potential clinical applications. *Journal of Molecular Medicine*, 82(5), 317–324. <https://doi.org/10.1007/s00109-004-0526-3>.
 - Wang, Z., Gerstein, M., & Snyder, M. (2009). The transcriptome is the complete set of transcripts in a cell, and their quantity. *Nature Reviews Genetics*, 10(1), 57–63. [papers2://publication/doi/10.1038/nrg2484](https://doi.org/10.1038/nrg2484).
 - Werry, N., Russell, S. J., Gillis, D. J., Miller, S., Hickey, K., Larmer, S., Lohuis, M., Librach, C., & LaMarre, J. (2022). Characteristics of miRNAs Present in Bovine Sperm and Associations with Differences in Fertility. *Frontiers in Endocrinology*, 13(May), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fendo.2022.874371>.
 - Wu, C., Wang, C., Zhai, B., Zhao, Y., Zhao, Z., Yuan, Z., Fu, X., & Zhang, M. (2021). Study on the region-specific expression of epididymis mRNA in the rams. *PLoS ONE*, 16(1 January), 1–18. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0245933>.
 - Xing, K., Chen, Y., Wang, L., Lv, X., Li, Z., Qi, X., Wang, X., Xiao, L., Ni, H., Guo, Y., & Sheng, X. (2022). Epididymal mRNA and miRNA transcriptome analyses reveal important genes and miRNAs related to sperm motility in roosters. *Poultry Science*, 101(1), 101558. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2021.101558>.
 - Yu, M., Zhang, X., Yan, J., Guo, J., Zhang, F., Zhu, K., Liu, S., Sun, Y., Shen, W., & Wang, J. (2022). Transcriptional Specificity Analysis of Testis and Epididymis Tissues in Donkey. *Genes*, 13(12). <https://doi.org/10.3390/genes13122339>.