



UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

Zootecnia y Gestión Sostenible

Conservación de Recursos Genéticos Animales

**SELECCIÓN DE GENES DE REFERENCIA Y
ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DIFERENCIAL EN
SEMEN EQUINO CRIOPRESERVADO**

TESIS DOCTORAL

Córdoba, 2015

Almudena Pérez Rico

Dirigido por:

Dr. D. José Luis Vega Pla

Dr. D. Francisco Crespo Castejón

TITULO: *Selección de genes de referencia y análisis de expresión diferencial en semen equino criopreservado*

AUTOR: *Almudena Pérez Rico*

© Edita: Servicio de Publicaciones de la Universidad de Córdoba. 2015
Campus de Rabanales
Ctra. Nacional IV, Km. 396 A
14071 Córdoba

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



TÍTULO DE LA TESIS:

Selección de genes de referencia y análisis de expresión diferencial en semen equino criopreservado

DOCTORANDO/A:

Almudena Pérez Rico

INFORME RAZONADO DEL/DE LOS DIRECTOR/ES DE LA TESIS

(se hará mención a la evolución y desarrollo de la tesis, así como a trabajos y publicaciones derivados de la misma).

El tema de la tesis ha sido un reto desde el principio por su complejidad y originalidad. Los espermatozoides carecen de actividad traductora pues no tienen ribosomas (exceptuando los de la mitocondrias). El contenido de RNA mensajero es muy pequeño y aún no está claro si se expresará en el óvulo después de la fecundación o sólo es un resto de la actividad de las epermatogonias. Sea como fuere, el análisis de este RNA mensajero puede ser significativo en el futuro como un marcador de fertilidad. Con este objetivo se pone el trabajo experimental en marcha siendo necesario lo primero de todo seleccionar los genes de referencia. Para células somáticas este tipo de genes está muy bien descrito pero para un tipo de célula tan especializada con el espermatozoide la terea ha sido compleja. Finalmente se ha podido definir un pequeño grupo de genes de referencia útil para trabajos de transcripción futuros.

Como consecuencia de las investigaciones realizadas se han ido publicando los resultados en congresos y revistas.

Publicaciones:

Pérez Rico, A., Crespo Castejón, F., Sanmartín Sánchez, L., Miró Arias, M., & Vega Pla, J. L. 2014. «Selección de genes de referencia en semen equino criopreservado para su uso en estudios de expresión genética con la técnica de PCR cuantitativa». *Sanidad Militar*, 70(1), 20-24.

Pérez-Rico, A., Crespo, F., Sanmartín, M. L., De Santiago, A., & Vega-Pla, J. L. 2014. «Determining ACTB, ATP5B and RPL32 as optimal reference genes for quantitative RT-PCR studies of cryopreserved stallion semen». *Animal reproduction science*, 149(3), 204-211.

Comunicaciones en Congresos:

«Selección de genes de referencia en semen equino criopreservado». *XIII Congreso de Veterinaria Militar*. 2013, Madrid. Pérez Rico A., Crespo Castejón F., Sanmartín Sánchez M.L., & Vega Pla J.L.

Posters en Congresos:

«Ubiquitin B gene as biomarker in horse sperm motility expression studies». *34th Conference for de ISAG*. 2014, Xi'an, China. Pérez-Rico, A., Crespo, F., Sanmartín-Sánchez, M. L., De Santiago, A., & Vega-Pla

«Protamina 1 como biomarcador de fragmentación del ADN en espermatozoides equinos criopreservados». *I Congreso de Sanidad Militar*. 2014, Granada. Pérez Rico, A; Crespo Castejón, F.

Premios:

“Veterinaria Militar General Sobreviela Monleón” 12ª Edición dentro del *XIII Congreso de Veterinaria Militar*. 2013, Madrid. «Genes de referencia en semen equino criopreservado». Pérez Rico A.

Por todo ello, se autoriza la presentación de la tesis doctoral.

Córdoba, 3 de febrero de 2015

Firma del/de los director/es



Fdo.: José Luis Vega Pla

Fdo.: Francisco Crespo Castejón

D. José Luis Vega Pla, Doctor en Veterinaria y Director del Laboratorio de Investigación Aplicada de Cría Caballar, y D. Francisco Crespo Castejón, Doctor en Veterinaria y Jefe del Centro Militar de Cría Caballar de Ávila, en su calidad de Directores de la Tesis Doctoral de D^a Almudena Pérez Rico.

INFORMAN:

Que el trabajo titulado “Selección de genes de referencia y análisis de expresión diferencial en semen equino criopreservado” realizado por D^a Almudena Pérez Rico, cumple todos los requisitos para ser juzgada y optar al título de Doctor en Veterinaria por la Universidad de Córdoba.

Córdoba, a 6 de febrero de 2015



Fdo.: José Luis Vega Pla

Fdo.: Francisco Crespo Castejón

Agradecimientos

En esta tesis doctoral, realizada en la Universidad de Córdoba, han participado de forma directa e indirecta numerosas personas, que con su apoyo, sus correcciones, su paciencia o simplemente su compañía, me han facilitado la consecución de este logro personal, un logro que hace unos años ni pensaba ni imaginaba poder conseguir.

En primer lugar a mis directores, a José Luis Vega Pla, por ser mi mentor y quien me dio la idea, la motivación y la orientación de este trabajo, por inculcar su lema de “*Estudia como si fueras a vivir siempre; vivid como si fueras a morir mañana*” en todos los que le rodean, gracias por tus enseñanzas y por depositar tu confianza en mí; a Francisco Crespo Castejón por sus valiosas correcciones, así como su aportación de ideas y análisis realizados, es todo un ejemplo de esfuerzo y superación; además, en él recuerdo el momento que, siendo estudiante de veterinaria y en unas prácticas de reproducción en Ávila, decidí orientar mi vida laboral hacia la profesión que hoy ejerzo, la Veterinaria Militar, una profesión casi desconocida para mí hasta ese momento. Gracias por el tiempo que habéis invertido en este proyecto, aún más sabiendo las muchas responsabilidades, profesionales y personales, que tenéis en vuestro quehacer diario.

A mis padres, por su apoyo incondicional, comprensión y cariño, por no exigir nunca nada y darme todo lo que tenían. Con sus valores inculcados, me han enseñado que con esfuerzo y trabajo se puede conseguir cualquier cosa.

A mi hermana, por ser la pionera y aventurera de la familia, tu iniciativa y tu alegría son ejemplo para todos. Por el hecho de estar inmersa en tu propio proyecto de doctorado, me has sabido comprender y apoyar, y estoy segura que muy pronto estaré sentada oyendo tu defensa de tesis. Tus largas conversaciones por Skype te hacen sentirte más cerca.

A mis profesores del Master, porque dieron el pistoletazo de salida a esta carrera que hoy termina, y sobre todo a mis compañeros de Master, porque hicieron de mi primer año en

Córdoba inolvidable y pude sentirme como en casa, en especial a Ana, Judith, Ana María y Andrés porque siguen estando a mi lado a pesar de estar tan lejos.

A todos mis amigos: los de Veterinaria, en especial a María, Mirella y Ruth; las niñas del Coso de Villafranca de la Sierra; los de Calzada de los Molinos; los de Vallecas; los militares, en especial a Juan por acompañarme y escuchar mis preocupaciones, y sobre todo mis presentaciones; . . . por vuestra amistad.

A Pablo Vega por ayudar en los inicios de la puesta a punto de la técnica, todo un mérito cuando aún sólo era estudiante de Biología.

A los compañeros del Laboratorio de Investigación Aplicada, porque han sido mi familia en Córdoba, me han ayudado siempre que lo he necesitado y, en estos años, hemos tenido oportunidad de celebrar buenas noticias juntos.

Al Servicio de Cría Caballar y los compañeros del mismo, por facilitar los medios materiales y muestras necesarias para la ejecución de este trabajo, en especial a Juan Galisteo y Álvaro De Santiago por los análisis de calidad seminal realizados.

A la Diputación de Córdoba, por proporcionar las instalaciones del Laboratorio de Investigación Aplicada, y en especial a sus integrantes, con los que compartimos edificio, que cada mañana tienen una sonrisa y una agradable conversación.

En definitiva, este trabajo va dedicado a las personas, las que están y las que ya no forman parte de mi vida, porque ellas me han llevado a donde estoy, y me siento muy orgullosa de lo aprendido; a todos ellos mi mayor reconocimiento y gratitud.

“Nada grande se ha hecho en el mundo sin una gran pasión”

(Hegel 1770-1831)

A mi familia

Índice

Agradecimientos	3
Índice	11
Índice de tablas y figuras	17
Abreviaturas	23
Resumen	27
Introducción	31
Revisión bibliográfica	37
1. Características y variabilidad del semen equino	39
2. Criopreservación seminal	40
3. Evaluación de la calidad seminal	41
❖ 3.1. Análisis de la motilidad y concentración espermática.....	42
❖ 3.2. Fragmentación del ADN espermático.....	45
4. Características y función del ácido ribonucleico	48
❖ 4.1. Expresión genética en el espermatozoide.....	50
❖ 4.2. Genes de referencia.....	51
❖ 4.3. Estudios de expresión genética en semen.....	52
5. Extracción de ARN de semen	53
❖ 5.1. Calidad de las muestras.....	54
❖ 5.2. Métodos de extracción de ARN:.....	56
❖ 5.3. Métodos para la síntesis de ADN complementario a partir de ARN total.....	56
6. Reacción en cadena de la polimerasa (Polimerasa Chain reaction)	57
7. La técnica de la PCR cuantitativa (qPCR)	58
8. Análisis de la curva de fusión	61
9. Ciclo de cuantificación (Quantification cycle)	63
10. Estrategias para la cuantificación de ARNm en qPCR	64
❖ 10.1. Cuantificación absoluta.....	64
❖ 10.2. Cuantificación relativa.....	64
11. Genes de referencia	66
12. Análisis estadístico	67
❖ 12.1. NORMFINDER.....	67

❖	12.2. BESTKEEPER	67
❖	12.3. GENORM v 2002.....	68
❖	12.4. REST 2009	69
Materiales y métodos.....		71
1.	Muestras	73
2.	Selección de genes de referencia y diseño de cebadores	76
3.	Extracción de ARN y RT-qPCR	77
4.	Análisis de datos.....	79
❖	4.1. Determinación de genes de referencia	79
❖	4.2. Genes de expresión genética diferencial.....	80
Resultados		81
1.	Cantidad y calidad de las muestras de ARN.....	83
2.	RT-qPCR	83
❖	2.1. Expresión genética.....	83
❖	2.2. Eficiencia de reacción PCR	84
❖	2.3. Curvas de amplificación y fusión	84
3.	Estabilidad de los genes de referencia y normalización de la expresión genética.	87
❖	3.1. NORMFINDER	87
❖	3.2. BESTKEEPER	88
❖	3.3. GENORM	90
4.	Expresión diferencial	92
❖	4.1. Espermatozoides estáticos (EST)	93
❖	4.2. Motilidad progresiva (PMOT)	94
❖	4.3. Velocidad curvilínea (VCL)	95
❖	4.4. Velocidad rectilínea (VSL)	96
❖	4.5. Velocidad promedio (VAP).....	97
❖	4.6. Linealidad (LIN)	98
❖	4.7. Índice de rectitud (STR)	99
❖	4.8. Índice de oscilación (WOB)	99
❖	4.9. Desplazamiento lateral de la cabeza (ALH)	100
❖	4.10. Frecuencia de batida (BCF)	101

❖ 4.11. Fragmentación	102
Discusión.	107
Conclusiones	117
Bibliografía	121
Anexo.....	137

Índice de tablas y figuras

Tabla 1.- Genes de referencia empleados en estudios de expresión genética en tejidos equinos.....	53
Tabla 2.- Parámetros de calidad seminal	75
Tabla 3.- Genes de referencia candidatos y las secuencias de los cebadores.....	77
Tabla 4.- Valores medios de ciclos de cuantificación (Cq) calculados por muestra.	83
Tabla 5.- Valores de eficiencia media de la reacción para cada gen.....	84
Tabla 6.- Grupos por motilidad progresiva.....	88
Tabla 7.- Valores de estabilidad intra y entre grupos para cada uno de los genes candidatos.	88
Tabla 8.- Estadística descriptiva calculada por BestKeeper.	89
Tabla 9.- Análisis de correlación entre los genes candidatos y estos con el índice BestKeeper.	89
Tabla 10.- Valor M de estabilidad calculado por GeNorm.	90
Tabla 11.- Valor M de la eliminación consecutiva del gen más inestable.	91
Tabla 12.- Clasificación de los genes de referencia analizados por las diferentes metodologías.	92
Tabla 13.- Valores estadísticos para los diferentes parámetros de calidad seminal.....	93
Tabla 14.- Resultados de expresión relativa de genes estudiados.....	105
Figura 1.- Representación gráfica de la curva de amplificación en una PCR a tiempo real	59
Figura 2.- Esquema de fluoróforo intercalante y sonda.	60
Figura 3.- Análisis de la curva de fusión.	62
Figura 4.- Curva de amplificación y curva de fusión de ACTB.	84
Figura 5.- Curva de amplificación y curva de fusión de ATP5B.....	85
Figura 6.- Curva de amplificación y curva de fusión de PRM1.....	85
Figura 7.- Curva de amplificación y curva de fusión de RPL32.....	85
Figura 8.- Curva de amplificación y curva de fusión de UBQ.....	85
Figura 9.- Curva de amplificación y curva de fusión de GAPDH.	86
Figura 10.- Curva de amplificación y curva de fusión de H2AI.....	86
Figura 11.- Curva de amplificación y curva de fusión de HSP90.....	86
Figura 12.- Curva de amplificación y curva de fusión de SDHA.	87
Figura 13.- Representación gráfica de estabilidad con GeNorm.....	90

Figura 14.- Determinación del número óptimo de genes de referencia.	91
Figura 15.- Histograma y gráfico de cajas y bigotes para porcentaje de EST.	93
Figura 16.- Diagrama de cajas y bigotes del nivel de expresión del percentil 40 y 60 para EST.	94
Figura 17.- Diagrama de cajas y bigotes del nivel de expresión del cuartil 1 y 3 para EST.	94
Figura 18.- Histograma y gráfico de cajas y bigotes para PMOT.	94
Figura 19.- Diagrama de cajas y bigotes del nivel de expresión del percentil 40 y 60 para PMOT. .	95
Figura 20.- Histograma y gráfico de cajas y bigotes para VCL.	95
Figura 21.- Diagrama de cajas y bigotes del nivel de expresión del percentil 40 y 60 para VCL.	95
Figura 22.- Diagrama de cajas y bigotes del nivel de expresión del cuartil 1 y 3 para VCL.	96
Figura 23.- Histograma y gráfico de cajas y bigotes para VSL.	96
Figura 24.- Diagrama de cajas y bigotes del nivel de expresión del percentil 40 y 60 para VSL.	96
Figura 25.- Diagrama de cajas y bigotes del nivel de expresión del cuartil 1 y 3 para VSL.	97
Figura 26.- Histograma y gráfico de cajas y bigotes para VAP.	97
Figura 27.- Diagrama de cajas y bigotes del nivel de expresión del percentil 40 y 60 para VAP.	97
Figura 28.- Diagrama de cajas y bigotes del nivel de expresión del cuartil 1 y 3 para VAP.	98
Figura 29.- Histograma y gráfico de cajas y bigotes para LIN.	98
Figura 30.- Diagrama de cajas y bigotes del nivel de expresión del percentil 40 y 60 para LIN.	98
Figura 31.- Diagrama de cajas y bigotes del nivel de expresión del cuartil 1 y 3 para LIN.	99
Figura 32.- Histograma y gráfico de cajas y bigotes para STR.	99
Figura 33.- Diagrama de cajas y bigotes del nivel de expresión del percentil 40 y 60 para STR.	99
Figura 34.- Histograma y gráfico de cajas y bigotes para WOB.	100
Figura 35.- Diagrama de cajas y bigotes del nivel de expresión del percentil 40 y 60 para WOB. .	100
Figura 36.- Diagrama de cajas y bigotes del nivel de expresión del cuartil 1 y 3 para WOB.	100
Figura 37.- Histograma y gráfico de cajas y bigotes para ALH.	101
Figura 38.- Diagrama de cajas y bigotes del nivel de expresión del percentil 40 y 60 para ALH. ..	101
Figura 39.- Diagrama de cajas y bigotes del nivel de expresión del cuartil 1 y 3 para ALH.	101
Figura 40.- Histograma y gráfico de cajas y bigotes para BCF.	102
Figura 41.- Diagrama de cajas y bigotes del nivel de expresión del percentil 40 y 60 para BCF.	102
Figura 42.- Diagrama de cajas y bigotes del nivel de expresión del cuartil 1 y 3 para BCF.	102

Figura 43.- Histograma y gráfico de cajas y bigotes para fragmentación a 0 horas.....	103
Figura 44.- Diagrama de cajas y bigotes del nivel de expresión para fragmentación a 0 horas.....	103
Figura 45.- Histograma y gráfico de cajas y bigotes para fragmentación a 4 horas.....	104
Figura 46.- Diagrama de cajas y bigotes del nivel de expresión para fragmentación a 4 horas.....	104
Figura 47.- Histograma y gráfico de cajas y bigotes para fragmentación a 6 horas.....	104
Figura 48.- Diagrama de cajas y bigotes del nivel de expresión para fragmentación a 6 horas.....	105

Abreviaturas

ACTB: Actin beta

ADNc: ADN complementario

ALH: Lateral head displacement

ARNm: ARN mensajero

ATP5b: ATP synthase subunit beta

BCF: Beat cross frequency

BLAST: Basic local alignment search tool

CASA: Computer assisted sperm analyzer

Cq: Quantification cycle

DNasa: Desoxirribonucleasa

EST: Espermatozoides estáticos

GAPDH: Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase

H2AI: Histone cluster 1

HSP90: Heat shock protein 90

LIN: Linearity

NCBI: National Center for Biotechnology Information

PCR: Polymerase chain reaction

PMOT: Progressive motility

PRM1: Protamine 1

qPCR: Quantitative polymerase chain reaction

RNasa: Ribonucleasa

ROS: Reactive oxygen species

RPL32: 60S ribosomal protein L32

RT-qPCR: Retro transcription-qPCR

SDHA: Succinate dehydrogenase complex, subunit A

STR: Straightness

UBQ: Ubiquitin

VAP: Average path velocity

VCL: Curvilinear velocity

VSL: Straight line velocity

WOB: Wobble

Resumen

La creación de bancos de germoplasma es una necesidad para realizar planes más dinámicos de selección de reproductores, siendo necesario abordar los estudios de calidad seminal desde diferentes puntos de vista. Un criterio de calidad seminal puede basarse en las diferencias de transcripción de algunos genes implicados en la espermatogénesis y la maduración espermática, que afectan a características seminales tan importantes como la motilidad progresiva y la fragmentación del ADN espermático. El espermatozoide maduro no tienen función de transcripción porque carece de ribosomas, a excepción de los intramitocondriales, y hace pensar que la pequeña cantidad de ARN que persiste en estas células es un reflejo de lo ocurrido en las etapas anteriores, lo que nos puede dar mucha información sobre alteraciones durante la espermatogénesis o marcadores de calidad seminal antes de una evaluación *in vivo*, además estos ARN pueden tener trascendencia en los inicios de la expresión del óvulo fecundado. Por otro lado, es importante poder trabajar con semen congelado, pues no siempre los sementales son accesibles para una extracción de semen fresco. Como primer paso en los estudios de expresión genética, es necesario definir genes de referencia estables. En este trabajo se analizan nueve genes candidatos, *beta-actina (ACTB)*, *ATP sintasa subunidad b (ATP5B)*, *gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH)*, *proteína de choque térmico (HSP90)*, *histona subunidad 2AI (H2AI)*, *protamina 1 (PRM1)* *proteína ribosomal L32 (RPL32)*, *succinato deshidrogenasa (SDHA)* y *ubiquitina (UBQ)*. Los genes *RPL32*, *ACTB* y *ATP5b* exhiben el mejor comportamiento y estabilidad, por lo que son los genes de referencia más adecuados para usar en estudios con espermatozoides vivos post-descongelación en équidos.

Además, se ha detectado la existencia de relaciones entre los diferentes genes estudiados con parámetros de calidad seminal. El gen *SDHA* está infraexpresado en espermatozoides con baja motilidad progresiva; el gen *UBQ* está sobreexpresado en espermatozoides con peor movimiento de linealidad y rectitud; el gen *PRM1* está infraexpresado en espermatozoides con alta fragmentación a las 0 y 4 horas postdescongelación; y el gen *GAPDH* está infraexpresado en espermatozoides con alta fragmentación a las 0 y 6 horas postdescongelación.

Introducción

Los análisis funcionales y estructurales del semen son poderosas herramientas para predecir el potencial fecundante de los machos en varias especies. Los parámetros de calidad seminal evaluados en el seminograma pueden no ser suficientes para una evaluación exhaustiva del potencial de fertilidad de un eyaculado. A pesar de que actualmente existen un mayor número de técnicas disponibles que permiten un examen más exhaustivo, la infertilidad idiopática demuestra que tenemos un conocimiento limitado de los procesos relacionados con la fertilidad. Parece que ciertos resultados contradictorios se pueden atribuir no sólo a la naturaleza heterogénea del eyaculado, sino también al hecho de que la fertilidad no puede ser definida por un único parámetro. Un ejemplo es proporcionado por el estudio de la relación entre la fertilidad y la motilidad. En efecto, se acepta generalmente que la motilidad de los espermatozoides es un factor determinante en la fertilidad normal masculina debido a su papel esencial para el transporte del material genético hasta el sitio de la fertilización. Aunque su correlación con la fertilidad todavía no se ha definido correctamente, la mayoría de las asociaciones estadísticamente significativas entre la motilidad de los espermatozoides y la fertilidad han oscilado entre 0,15 y hasta 0,83 en diferentes estudios (Amann & Hammerstedt 1993, Kjaestad et al. 1993, Bailey et al. 1994, Stålhammar et al. 1994, Januskauskas et al. 2003). Los descubrimientos recientes en el campo de la genómica comparativa y el análisis global de la expresión génica han proporcionado nuevas herramientas moleculares de detección, que permiten la evaluación del potencial fertilizante del semen. Por lo tanto, el contenido heterogéneo de ARN de un espermatozoide podría ser utilizado como un modelo para el análisis genómico de la calidad seminal, tanto en términos de la espermatogénesis como del potencial de fertilidad. Las diferentes transcripciones que están presentes en los espermatozoides pueden afectar a las vías metabólicas o funciones, y plantean muchas preguntas sobre su significado y la complejidad de la espermatogénesis. Para la industria de la producción animal, la subfertilidad es de gran preocupación porque sigue siendo una medida no predecible. De hecho, la selección de machos para la reproducción de especies, requiere una evaluación *in vivo* de la fertilidad, que se lleva a cabo durante un período que puede ejecutarse desde varios meses a varios años (Bissonnette et al. 2009). Para la evaluación de la fertilidad real es necesario evaluar los intentos de cría, ya sea por la descendencia a lo largo de su vida reproductiva o por el porcentaje de gestaciones positivas en una determinada estación

reproductiva. Sería deseable poder predecir la fertilidad en un menor tiempo con unos costes reducidos.

La hipótesis de que los ARN de espermatozoides son sólo un vestigio de la transcripción durante la espermatogénesis, no puede explicar la retención aparentemente selectiva de ARNs particulares (Gur y Breitbart 2006). Es bien sabido que los espermatozoides del eyaculado no muestran ningún ARN mensajero (ARNm) nuevo, y por lo tanto, todas las transcripciones se derivan de las células testiculares germinales (Ostermeier et al. 2002). Recientemente, se demostró que en varias especies, incluyendo humanos, los espermatozoides capacitados pueden traducir proteínas, y la fuente de ARNm para la traducción de la proteína son ARNm de larga duración (Gur y Breitbart 2006). Los datos actuales apoyan la hipótesis de que al menos algunos transcritos de ARNm de esperma no son residuales, y que las células son capaces de retener selectivamente ARNs particulares, con lo que se sostiene fuertemente la teoría de que pueden tener una función después de la fertilización (Avendano et al. 2009).

A la vista de las diferencias en los parámetros de calidad seminal que existen entre los sementales, se trata de encontrar variaciones genéticas que pudiesen justificar las diferencias entre individuos, con el fin de seleccionar en el futuro los sementales que más garantías ofrezcan a la hora de criopreservar el semen en un programa de conservación *ex situ*. Este estudio que se realiza sobre el semen congelado de caballos pertenecientes a Cría Caballar de las Fuerzas Armadas, podría servir de base para evaluar dosis seminales de sementales sexualmente inactivos que se conservan en los bancos de germoplasma.

Los estudios de expresión genética comienzan por determinar la producción de ARN de una serie de genes en una situación concreta. Lo ideal *a priori* sería estudiar estos perfiles directamente en las espermatogonias, para lo cual sería necesario realizar biopsias testiculares, algo muy complejo de llevar a cabo en ejemplares en plena actividad sexual e imposible en sementales muertos con semen criopreservado. Los perfiles de ARN de los espermatozoides son un reflejo de la actividad de las espermatogonias (Lambard et al. 2004) por lo que se podrían utilizar para evaluar la citada variabilidad.

Los espermatozoides son células que carecen de ribosomas en el citoplasma, exceptuando los intramitocondriales, con lo que las cantidades de ARN son muy inferiores a las de las células somáticas, además el ARN se degrada a gran velocidad una vez que la

célula entra en un proceso de apoptosis. En el semen congelado se intenta mantener la viabilidad de los espermatozoides mediante la aplicación de diluyentes y crioprotectores que alimentan al espermatozoide e impiden que se deteriore durante el proceso de congelación. Aun así los espermatozoides descongelados apenas se mantienen vivos unas horas, por lo que se deduce que los procesos de apoptosis ya se han iniciado, y como consecuencia las cantidades de ARN también disminuyen rápidamente. El caso del caballo se agrava por la enorme dificultad que se está encontrando al utilizar protocolos de extracción de ARN de semen humano que no rinden de igual manera en esta especie (Wrench et al. 2010), además existen diferencias entre especies que requieren ajustes para optimizar los protocolos de aislamiento de ARN del esperma (Das et al. 2010).

Los estudios de expresión genética requieren de unos genes que se usan a modo de calibradores, se trata de genes que se expresan de forma constante e independiente del estado fisiológico de la célula. A estos genes se les denomina genes de referencia. Por lo tanto, el primer paso antes de abordar estudios más específicos de expresión genética, es la identificación y caracterización de genes de referencia. Las dificultades se suman, por un lado la labilidad intrínseca del semen equino y por otro los efectos de la congelación.

El objetivo general de este trabajo es determinar la estabilidad en la expresión de varios genes para su empleo como genes de referencia en estudios de expresión genética en semen criopreservado equino, tomando como referencia parámetros de calidad seminal. Los objetivos específicos son:

1. Análisis de la transcripción de varios genes candidatos a genes de referencia en muestras de semen equino criopreservado.
2. Selección de genes de referencia adecuados para espermatozoides equinos criopreservados.
3. Posibles relaciones entre la transcripción de los genes de interés descartados como genes de referencia con diferentes parámetros de calidad seminal.

Revisión bibliográfica

1. Características y variabilidad del semen equino

El espermatozoide (del griego *esperma*, semilla, y *zoon*, animal) o gameto masculino, es una célula haploide altamente diferenciada, que tiene por función transportar el genoma masculino y fusionarse con el gameto femenino (el ovocito), para dar lugar a un nuevo individuo diploide y propagar así la especie.

El espermatozoide se origina en los túbulos seminíferos de los testículos, mediante un proceso denominado espermatogénesis. Este proceso consta de cuatro etapas consecutivas:

- La multiplicación o mitosis de las espermatogonias, que son células diploides que proliferan continuamente para mantener su número.
- La meiosis, en la que los espermatocitos primarios diploides dan lugar a los espermatocitos secundarios haploides.
- La espermiogénesis, en la cual un porcentaje de estas células sufre una serie de modificaciones (cambios en su morfología y pérdida de algunas de sus organelas) para transformarse en células diferenciadas, que son los espermatozoides.
- La capacitación, que es una última fase de maduración y activación que se produce durante su tránsito por el epidídimo (Amann 2008), ya que estas células haploides diferenciadas carecen de capacidad fecundante y poseen escasa motilidad.

La espermatogénesis tiene una duración en el caballo de 52 días. La participación de las células de Sertoli en la regulación y desarrollo de este proceso es de vital importancia, ya que proporcionan soporte estructural y nutricional a las células germinales entre otras funciones (Amann 2008; L. Johnson, Thompson, y Varner 2008).

Los espermatozoides capacitados ya pueden alcanzar el ovocito, unirse a la zona pelúcida y experimentar un nuevo cambio, la reacción acrosómica. Las proteasas liberadas por el acrosoma, mediante exocitosis, degradan las glicoproteínas que envuelven la membrana plasmática del ovocito, permitiendo que el espermatozoide fusione su núcleo con el del gameto femenino (Gadella et al. 1999; Grunewald et al. 2006; Gadella 2008). Este proceso ocurre *in vivo*, durante el tránsito del espermatozoide por el aparato

reproductor de la hembra. Entre otros cambios, tiene lugar la pérdida de proteínas que envuelven el espermatozoide y que provienen del plasma seminal.

Hay factores como la *raza* y la *edad* que influyen mucho en la gran variabilidad del semen equino, y afectan a parámetros de calidad seminal como son el volumen total de semen y libre de gel, el porcentaje de espermatozoides móviles y espermatozoides muertos, en la concentración y en la morfología entre otros (Pickett 1993; Dowsett y Knott 1996).

Otros factores que pueden intervenir en la gran variabilidad del semen equino son las distintas *subpoblaciones espermáticas* que conviven con diferentes características de viabilidad y funcionalidad (Mortimer 1997; Abaigar et al. 1999; Mortimer 2000; Quintero-Moreno et al. 2003; Martínez-Pastor et al. 2005; Martínez et al. 2006) y la gran *carga microbiana* que presenta (Madsen y Christensen 1995). En el aparato reproductor del semental habitan un gran número de bacterias comensales, de tal modo que cuando se produce algún tipo de alteración en esta flora normal, se origina un sobrecrecimiento de oportunistas y de bacterias patógenas. Un estudio en semen humano mostró que la contaminación bacteriana del eyaculado podía inducir la activación de los mecanismos de apoptosis en los espermatozoides, con el consiguiente descenso de viabilidad (Villegas et al. 2005).

2. Criopreservación seminal.

La congelación de semen consiste en un proceso que pasa inicialmente por la eliminación del plasma seminal, posteriormente las células se resuspenden en un diluyente de congelación, dejándolas un tiempo para que se equilibren. La mayoría de los diluyentes que incluyen crioprotectores, tienen una osmolaridad mucho mayor que las soluciones fisiológicas, para que el espermatozoide se deshidrate. Por ese motivo es necesario dejarle un tiempo de equilibrado con el crioprotector y minimizar así el daño debido a la deshidratación. Seguidamente, se procede al descenso de temperatura a un ritmo que viene determinado por el tamaño y permeabilidad de la célula, sumergiéndose finalmente en nitrógeno líquido a -196 °C.

Durante este proceso los espermatozoides sufren una serie de daños letales y subletales, que son uno de los motivos de la baja fertilidad del semen descongelado equino

(Watson 2000). Estos daños se deben a cambios bruscos de temperatura y osmolaridad del medio, así como al estrés oxidativo que sufren. Tradicionalmente, se asociaba este daño a la formación de cristales de hielo intracelulares, que producían un efecto de rotura de la membrana plasmática. El descenso gradual de la temperatura a la que se someten los espermatozoides durante la congelación evita en gran medida la formación de cristales de hielo, por ello, el daño celular que sufre el espermatozoide en este proceso se achaca al estrés osmótico y oxidativo (Morris 2006; Morris et al. 2007). Por tanto, la calidad del semen congelado depende de la capacidad del espermatozoide para superar el proceso de congelación sin perder sus principales funciones (viabilidad, motilidad y otros muchos atributos biológicos más complejos) (Sieme y col. 2008). Aunque el espermatozoide está sometido a diversos tipos de estrés, cabe resaltar que existe una interconexión entre ellos y que, por lo tanto, su separación sólo tiene sentido desde el punto de vista didáctico. Todos estos cambios producen muerte de los espermatozoides y daños subletales similares a la apoptosis que disminuyen la vida media y la capacidad fecundante de las células (Ortega-Ferrusola et al. 2008).

3. Evaluación de la calidad seminal

Un problema asociado a la apreciación de variaciones en la calidad seminal es el valor relativo de los parámetros utilizados. Una baja calidad seminal suele ser indicador de subfertilidad, sin embargo, una buena calidad de semen no es garantía aceptable de fertilidad (Colebrander y col., 2003). El análisis seminal rutinario evalúa ciertas características de la célula espermática que son necesarias para la fertilización del óvulo, aunque algunos autores coinciden en afirmar que no existe relación alguna entre los parámetros básicos de calidad seminal y la fertilidad (Hammerstedt 1996; Johnson et al. 2000; Gadea 2001), de hecho ningún parámetro del análisis seminal rutinario explica más del 30% de la fertilidad de dicho semen (Quintero-Montero y col., 2003).

El análisis de la calidad seminal incluye el estudio de varios parámetros utilizando diferentes metodologías (Restrepo et al. 2013).

1. Se utilizan técnicas convencionales para el análisis de:
 - a. Volumen.

- b. Concentración.
 - c. Proporción de espermatozoides vivos y muertos.
 - d. Características morfológicas de las células espermáticas.
 - e. Integridad de la membrana plasmática.
 - f. Motilidad total, progresiva, velocidad y duración del movimiento de los espermatozoides.
2. Sistemas de análisis de semen asistido por ordenador para el estudio de concentración espermática y motilidad.
 3. Técnicas fluorescentes para el estudio de:
 - a. Integridad de la membrana plasmática.
 - b. Integridad del acrosoma.
 - c. Integridad del ADN espermático.
 - d. Evaluación de la actividad mitocondrial.
 - e. Evaluación de la estabilización lipídica de la membrana plasmática.
 - f. Evaluación de la capacitación espermática por detección del flujo de calcio o de fosfotirosina.
 4. Técnicas de evaluación de capacidad fertilizante *in vitro*:
 - a. Ensayo hemozona.
 - b. Prueba de penetración de oocitos de hámster libres de zona pelúcida.

❖ *3.1. Análisis de la motilidad y concentración espermática.*

Hasta hace poco tiempo, el estudio de la calidad espermática se ha basado en la evaluación subjetiva de algunos parámetros tales como la motilidad masal y la motilidad progresiva, y en la evaluación objetiva de otros parámetros como la concentración y las anomalías morfológicas. Cuando se lleva a cabo una estimación subjetiva de la motilidad al microscopio se han observado variaciones del 30 al 60% en el mismo eyaculado (Verstegen, Iguer-Ouada, y Onclin 2002), lo que condujo a que se propusieran diferentes sistemas de evaluación objetivos.

Dentro de las metodologías empleadas para el análisis de motilidad espermática encontramos:

- Evaluación subjetiva bajo microscopio: es un método convencional que permite una estimación subjetiva y requiere personal experimentado para

una mejor interpretación. Se promedian los porcentajes de motilidad de cinco campos de observación diferentes (400x). Es una estimación visual de la motilidad, consiste en colocar una gota de semen diluido entre un porta y un cubreobjetos y observar sobre pletina térmica a 37° C con microscopio óptico.

- Evaluación objetiva mediante el uso de sistemas automatizados (CASA): fue propuesto por primera vez por Dott y Foster (1979). Actualmente existen varios software comerciales como SCA®, ISAS® o QualiSperm™, entre otros. Estos sistemas, evalúan las características de motilidad espermática con más alto grado de repetibilidad y fiabilidad que los métodos tradicionales, permitiendo la visualización y digitalización de imágenes sucesivas, además proporcionan una información exacta sobre la cinética de las células espermáticas a nivel individual. Evalúa los porcentajes de motilidad total (%) y de motilidad progresiva (PMOT, %), velocidad curvilínea (VCL, $\mu\text{m/s}$), velocidad rectilínea (VSL, $\mu\text{m/s}$), velocidad media (VAP, $\mu\text{m/s}$), índice de linealidad ($\text{LIN} = \text{VSL}/\text{VCL}$, %), índice de rectitud ($\text{STR} = \text{VSL}/\text{VAP}$, %), índice de oscilación ($\text{WOB} = \text{VAP}/\text{VCL}$, %) y los parámetros de angulosidad y oscilación de la cabeza: amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza (ALH, μm) y frecuencia de batida (BCF, Hz).

Se considera normal cuando el 50 % de los espermatozoides o más presentan una motilidad progresiva rápida. La disminución de la motilidad se denomina astenozoospermia, puede ser un hallazgo aislado en el espermograma o acompañarse de alteraciones en la concentración y morfología de los espermatozoides (que es lo más común), en este último caso indica un daño global de la espermatogénesis. La disminución de la motilidad espermática tiene múltiples causas que no se pueden diagnosticar por el simple análisis seminal, y en la mayoría de los casos, tampoco es posible establecer un pronóstico por este examen. El porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva se ha asociado con la fertilidad y se considera un parámetro fundamental para la determinación de la capacidad fertilizante de los espermatozoides (Varner et al. 2008) a pesar de que no se ha correlacionado directamente con la fertilidad real (Jasko y col., 1992; Malmgren 1997; Katila 2001; Varner et al. 2008).

La concentración seminal puede ser determinada mediante:

- **Hemocitometría:** es una técnica que utiliza cámaras hemocitométricas que permite determinar el número de espermatozoides presentes en una cámara de recuento celular, existen diferentes modelos como la cámara de Thomas, Bürker-Türk o Neubauer, siendo esta última la más utilizada. Su bajo coste hace de este método uno de los más empleados; sin embargo, puede presentar una variabilidad entre réplicas causada por las diluciones previas, la falta de homogeneidad en la distribución de la muestra en la cámara, o la influencia del observador (Lu et al., 2004).
- **Espectrofotometría:** es una técnica rápida y fácil que realiza una medición de forma indirecta, relacionando el grado de absorción o dispersión de la luz que provocan los espermatozoides de una muestra de esperma con su concentración. Sin embargo, para que este método se muestre preciso requiere una calibración previa mediante una curva determinada por recuento microscópico en cámara, debido a que la transmitancia varía de acuerdo a la concentración espermática. Además, depende también del tamaño y forma del espermatozoide o del índice de refracción, factores que son variables entre individuos (Mocé and Graham, 2008). Aunque este método funciona correctamente en muestras espermáticas puras, presenta sus limitaciones cuando la solución está contaminada con sustancias no espermáticas, hecho común en el esperma del semental, pudiendo llevar a una sobreestimación de la concentración espermática (Love, 2012).
- **Sistemas CASA:** permiten un recuento rápido pero con un mayor coste. Los equipos deben de estar correctamente calibrados para un recuento correcto. Además, estos métodos se ven influenciados por los componentes de los distintos diluyentes (Love, 2012).
- **Contadores espermáticos basados en fluorescencia:** es un sistema de conteo celular automático que consiste en la tinción de núcleos celulares con yoduro de propidio, implementado en un pequeño microscopio de fluorescencia combinado con una cámara CCD y el análisis de imágenes mediante un software específico. Un ejemplo comercial es Nucleocounter®.

Presenta la misma problemática que el sistema anterior (Christensen et al., 2005; Love, 2012).

- Citometría de flujo: cuantifica el ADN previamente teñido con un fluorocromo para calcular el número de células en base a la cantidad de ADN presente en el espermatozoide. Aunque es una técnica muy precisa, presenta el inconveniente de que los fluorocromos pueden unirse a otros componentes del eyaculado (por ejemplo células somáticas) o del diluyente, pudiendo igualmente sobreestimar la concentración espermática (Petrunkina and Harrison, 2011).

❖ 3.2. Fragmentación del ADN espermático

Este parámetro tiene un notable interés dado que la transferencia de la molécula de ADN íntegra e intacta desde el espermatozoide al óvulo, es esencial para conseguir la gestación de un individuo normal. Existen una serie de estudios que evalúan los daños en el ADN del espermatozoide en el ser humano (Evenson et al. 1983) y en diferentes especies animales (Rybar et al. 2004) que ponen de manifiesto una fuerte relación entre la fragmentación de la cromatina y la infertilidad. A su vez, la fragmentación del ADN está poco correlacionada con los parámetros clásicos de la calidad del espermatozoide (Giercman et al. 2003), por lo que resulta un factor interesante de estudiar en un análisis seminal, porque podría resolver una proporción significativa de casos de infertilidad por factor masculino que permanecen sin diagnosticar. Además, existe la evidencia de que el estado de la cromatina espermática en el momento de la fecundación también puede influir en la supervivencia embrionaria, y que esto podría representar una proporción significativa de lo que fue considerado típicamente como factor de infertilidad femenino (D'Occhio et al. 2007).

La calidad de una muestra espermática se deteriora con el tiempo tras la eyaculación; de hecho, determinados parámetros críticos en la fertilidad como la motilidad, decrecen con rapidez si no se utilizan diluyentes y estrategias de conservación óptimas. También se ha visto que existe pérdida de la calidad del ADN espermático con el tiempo tras la eyaculación, por lo que la calidad de una muestra seminal va variando a lo largo de su vida útil, y se ha comprobado que el tiempo es un factor que se debe considerar en el momento de evaluar los valores de fragmentación. La dinámica de fragmentación del ADN

del espermatozoide, en términos de velocidad, varía entre especies y entre los individuos de cada especie (Gosálvez et al. 2010). López Fernández y col., en un estudio llevado a cabo en 2007 sobre semen de caballo refrigerado y congelado, encontraron que tras incubar las muestras a 37°C simulando la temperatura corporal de la yegua, el daño del ADN espermático se incrementaba considerablemente en las 6 primeras horas de incubación superando el 50% en este periodo de tiempo y llegando prácticamente al 100% a las 48 horas.

La criopreservación no afecta el valor basal de fragmentación de la muestra seminal, pero sí que acelera la velocidad de degradación tras la descongelación y puede ser el fenómeno que contribuye de una manera significativa a la disminución de calidad seminal en el semental. En términos de dinámica, se puede comprobar que la viabilidad espermática, estudiada como pérdida de la calidad de membranas, decrece a medida que la fragmentación aumenta (López-Fernández et al. 2008; Cortés-Gutiérrez 2008; Gosálvez et al. 2009). Sin embargo, no hay correlación entre ambos parámetros cuando se realiza un estudio dinámico en el tiempo. El valor real de fragmentación del ADN del espermatozoide cuando éste ha penetrado la membrana celular del oocito podría ser más elevado que el estimado después de la eyaculación o la descongelación (Gosálvez et al. 2010). Estos hechos resultan de gran importancia a la hora del manejo de semen congelado en los diferentes programas de reproducción asistida.

El daño o fragmentación del ADN del espermatozoide se podría explicar por la existencia de roturas en la cadena del ADN en células maduras durante el intercambio del complejo de histonas por el de protaminas que ocurre en el proceso de la espermiogénesis. Este intercambio, dirigido a conseguir una mayor compactación de la molécula de ADN, genera cierto nivel de estrés en la torsión de la molécula de ADN, dado que existe un súper-enrollamiento heredado de la presencia de histonas. Para eliminar este tipo de tensiones y facilitar el reemplazamiento de las histonas por protaminas se generan unas roturas en las moléculas de ADN que serán posteriormente reparadas. Este tipo de daño y reparación netamente estructural, se ha demostrado en espermátidas en estado de elongación de ratones (Agarwal & Allamaneni 2004) y posiblemente también ocurra de forma similar en otras especies; la presencia de anomalías que impidan que todo el proceso concluya, podría dar lugar a una compactación incompleta de la cromatina durante el

proceso de maduración de tal forma que regiones con roturas no reparadas pueden persistir en las células del esperma maduro.

La fragmentación del ADN puede ser también consecuencia de un exceso de *estrés oxidativo* en el tracto reproductivo masculino. El estrés oxidativo puede desencadenarse cuando la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) supera la actividad de los agentes antioxidantes presentes en el plasma seminal, incluyendo enzimas tales como la superóxido dismutasa, la catalasa o la glutatión peroxidasa, así como agentes que bloquean la cascada de reacciones redox (Zini et al. 2001). Normalmente este tipo de daño suele generar roturas en una de las dos hebras de la doble cadena del ADN.

Una tercera causa de fragmentación del ADN implica al *proceso apoptótico* como un suceso de muerte celular programada, tiene lugar durante la formación de las espermátidas en las paredes de los túmulos seminíferos del testículo (Tomlinson et al. 2001; Erenpreiss et al. 2002). En este caso, las células de Sertoli, presentes también en las paredes de dichos túbulos, fagocitan y limpian los residuos celulares. No obstante, si la incidencia del fenómeno apoptótico tiene lugar tras la salida del espermatozoide a la luz de los túbulos seminíferos, podrían generarse una serie de metabolitos presentes en el líquido seminal, que no serán retirados una vez que se ha producido la eyaculación y que podrían contribuir a acelerar el proceso de degradación del ADN de otros espermatozoides. Esta situación es especialmente crítica cuando se maneja un eyaculado para una posterior inseminación o congelación, en estas circunstancias se genera un acumulo no deseable de metabolitos altamente reactivos, tales como enzimas celulares, enzimas procedentes del acrosoma, nucleares y enzimas de remodelación de la cromatina, como la topoisomerasa, que pueden ser activas sobre núcleos espermáticos normales, contribuyendo e incluso acelerando el proceso de degradación celular.

Existen varias estrategias para estudiar la fragmentación del ADN en muestras de esperma. En el primer grupo, se incluyen aquellas tecnologías que miden la capacidad diferencial que presenta la cromatina y en particular el ADN, para desnaturalizarse frente a determinados tratamientos. En este grupo se incluyen técnicas tales como el *Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA)* (D. P. Evenson 1999), el *DNA Breakage Detection-Fluorescence In Situ Hybridization (DBD-FISH)* (J L Fernández et al. 2000), *el ensayo cometa* bajo condiciones desnaturalizantes (Singh et al. 1988) y *el Sperm Chromatin*

dispersión Test (SCD) (José Luis Fernández et al. 2005). En un segundo nivel se pueden incluir aquellas metodologías encaminadas a marcar las roturas en la cadena de ADN, tanto de cadena sencilla como de cadena doble, incorporando moléculas trazadoras en ciertos extremos de la rotura, tales como la *Terminal dUTP Nick-End Labeling (TUNEL)* (Lopes et al. 1998) o la *In Situ Nick Translation (ISNT)* (Gorczyca, Gong, y Darzynkiewicz 1993).

4. Características y función del ácido ribonucleico

El ácido ribonucleico (ARN o RNA, de su nombre en inglés *RiboNucleic Acid*) es un ácido nucleico formado por una cadena de ribonucleótidos. Está presente tanto en las células procariotas como en las eucariotas, y es el único material genético de ciertos virus (virus ARN). El ARN celular es lineal y de hebra sencilla, pero en el genoma de algunos virus es de doble hebra.

En los organismos celulares desempeña diversas funciones. Es la molécula que dirige las etapas intermedias de la síntesis proteica; el ADN no puede actuar solo, y se vale del ARN para transferir esta información vital durante la síntesis de proteínas (producción de las proteínas que necesita la célula para sus actividades y su desarrollo). Varios tipos de ARN regulan la expresión génica, mientras que otros tienen actividad catalítica. El ARN es, pues, mucho más versátil que el ADN.

Como el ADN, el ARN está formado por una cadena de monómeros repetitivos llamados nucleótidos. Los nucleótidos se unen uno tras otro mediante enlaces fosfodiéster cargados negativamente.

Cada nucleótido está formado por una molécula de monosacárido de cinco carbonos (pentosa) llamada ribosa (desoxirribosa en el ADN), un grupo fosfato, y uno de cuatro posibles compuestos nitrogenados llamados bases: adenina, guanina, uracilo (timina en el ADN) y citosina.

A diferencia del ADN, las moléculas de ARN son de cadena simple y no suelen formar dobles hélices extensas. No obstante, sí se pliega como resultado de la presencia de regiones cortas con apareamiento intramolecular de bases, es decir, pares de bases formados por secuencias complementarias más o menos distantes dentro de la misma

hebra. El ARNt posee aproximadamente el 60% de bases apareadas en cuatro brazos con estructura de doble hélice.

Una importante característica estructural del ARN que lo distingue del ADN es la presencia de un grupo hidroxilo en posición 2' de la ribosa, que causa que las dobles hélices de ARN adopten una conformación A, en vez de la conformación B que es la más común en el ADN (Salazar et al. 1993). Esta hélice A tiene un surco mayor muy profundo y estrecho y un surco menos amplio y superficial (Hermann y Patel 2000). Una segunda consecuencia de la presencia de dicho hidroxilo es que los enlaces fosfodiéster del ARN de las regiones en que no se forma doble hélice son más susceptibles de hidrólisis química que los del ADN; los enlaces fosfodiéster del ARN se hidrolizan rápidamente en disolución alcalina, mientras que los enlaces del ADN son estables (Mikkola et al. 1999). La vida media de las moléculas de ARN es mucho más corta que las del ADN, de unos minutos en algunos ARN bacterianos o de unos días en los ARNt humanos (Devlin 2004).

La biosíntesis de ARN está catalizada normalmente por la enzima ARN polimerasa que usa una hebra de ADN como molde, proceso conocido con el nombre de transcripción. Por tanto, todos los ARN celulares provienen de copias de genes presentes en el ADN.

Tras la transcripción, la mayoría de los ARN son modificados por enzimas. Por ejemplo, al pre-ARN mensajero eucariota recién transcrito se le añade un nucleótido de guanina modificado (7-Metilguanosina) en el extremo 5' por medio de un puente de trifosfato formando un enlace 5'→5' único, también conocido como "capucha" o "caperuza", y una larga secuencia de nucleótidos de adenina en el extremo 3' (cola poli-A); posteriormente se le eliminan los intrones (segmentos no codificantes) en un proceso conocido como splicing.

El ARN mensajero (ARNm) es el tipo de ARN que lleva la información del ADN a los ribosomas, el lugar de la síntesis de proteínas. La secuencia de nucleótidos del ARNm determina la secuencia de aminoácidos de la proteína. Por ello, el ARNm es denominado ARN codificante.

No obstante, muchos ARN no codifican proteínas, y reciben el nombre de ARN no codificantes; se originan a partir de genes propios (genes ARN), o son los intrones rechazados durante el proceso de ensamblado del ARNm (splicing). Son ARN no codificantes el ARN de transferencia (ARNt) y el ARN ribosómico (ARNr), que son

elementos fundamentales en el proceso de traducción, y diversos tipos de ARN reguladores (Wirta 2006). Otros ARN no codificantes, denominados ribozimas, son capaces de catalizar reacciones químicas, como cortar y unir otras moléculas de ARN (Rossi 2004), o formar enlaces peptídicos entre aminoácidos en el ribosoma durante la síntesis de proteínas (Nissen et al. 2000).

❖ 4.1. *Expresión genética en el espermatozoide*

En el proceso de espermiogénesis, el núcleo del futuro espermatozoide se compacta mucho más al cambiar las histonas por protaminas, de tal forma que no puede haber ni replicación ni transcripción (se encuentra en la fase G₀ del ciclo celular). La inactividad transcripcional del núcleo hace que el espermatozoide sea dependiente de modificaciones postranscripcionales como la fosforilación de proteínas necesarias para adaptar su función de acuerdo a las necesidades. En la fase de maduración se elimina gran parte del citoplasma por desplazamiento del mismo hacia la pieza terminal de la cola, originando la llamada gota citoplasmática. Junto con el citoplasma también son eliminadas la mayoría de organelas, dejando sólo algunas de ellas que son modificadas para la función del espermatozoide. La traducción de algunos ARNm en proteínas, podrían ocurrir hasta varios días después del cese de la transcripción y antes de la finalización de la espermiogénesis. Por lo tanto, los ARNm presentes en los espermatozoides maduros parecen ser más o menos similares a los se encuentran en los testículos y pueden reflejar el desarrollo de la espermatogénesis (Lambard et al. 2004).

Aunque es ampliamente aceptado que los espermatozoides maduros no presentan traducción de ARNm a proteína, un estudio de Gur y Breitbart en 2006 demuestra, por primera vez, la incorporación de aminoácidos marcados en polipéptidos durante la capacitación espermática. A diferencia de los ribosomas 80S del citoplasma, los ribosomas 55S mitocondriales están presentes en las fracciones polisomales, lo que indica que estos ribosomas participan activamente en la traducción de proteínas en los espermatozoides. La inhibición de la traducción proteica reduce de manera significativa la motilidad espermática, capacitación y la tasa de fertilización *in vitro* (Gur y Breitbart, 2006). Así pues, algunos genes nucleares son expresados como proteínas en los espermatozoides durante su estancia en el tracto reproductor femenino hasta la fecundación. Los ARNm en el esperma podrían tener su origen en moléculas de ARNm de larga duración transcritos

durante la espermatogénesis (Gur y Beitbart, 2006). La localización de los ARNm y las proteínas expresadas en determinadas localizaciones celulares puede ser una indicación del sitio de traducción de proteínas, esto sugiere que la traducción de proteínas puede ocurrir en la parte media, en las mitocondrias y / o en la cabeza.

Se ha informado de que existe una baja persistencia de ARNm en células maduras de espermatozoides, pero es un nivel detectable (Miteva et al. 1995). Naz en 1998 describió la existencia de las actividades de transcripción y traducción en el espermatozoide humano durante la capacitación y la reacción acrosómica, que también podría explicar la presencia de ARNm en los espermatozoides maduros.

Existe la teoría de que la información de estos ARNm almacenada en los espermatozoides puede ser utilizada durante los primeros pasos de la fecundación (Braude, Bolton, y Moore 1988; Siffroi y Dadoune 2001).

El ARNm de los espermatozoides proporciona un registro histórico de la espermatogénesis, sobre la base del perfil transcripcional obtenido. En el futuro, esta información puede ser utilizada para investigar la respuesta de las células a los cambios en el medio ambiente o las condiciones que alteran la expresión de ARNm. La expresión de los genes se puede estudiar en condiciones diferentes, lo que permite profundizar en los mecanismos que pueden afectar a la fertilidad. Estudios preliminares en hombres (Samplaski et al. 2010) han mostrado un patrón de expresión genómica alterado en los espermatozoides de infértiles pudiendo llegar a ser una técnica útil en los sementales que están expuestos a factores medioambientales determinados, y que podría ponerse a punto para la selección de reproductores.

❖ 4.2. *Genes de referencia*

Para llegar a conclusiones válidas en cualquier estudio de expresión genética es muy importante contar con un control interno estable para normalizar el efecto de la cantidad de material inicial, la eficiencia enzimática, y las diferencias de actividad transcripcional global entre los tejidos o células para la medición de los niveles de expresión (Vandesompele et al. 2002; Cappelli et al. 2008). Un gen de referencia ideal sería aquel que se expresa en todos los tipos celulares y no se ve afectado por procesos patológicos ni por el procedimiento experimental. Los genes de referencia son expresados por cualquier tipo de célula, pero su expresión varía entre los tejidos y órganos (Kriegova

et al. 2008). También los procedimientos experimentales pueden tener influencia en la expresión de estos genes. Por tanto, es necesario evaluar múltiples genes de referencia antes de su uso, en el tejido u órgano de interés, y también bajo las condiciones experimentales pertinentes (Cappelli et al. 2008). Sin embargo, muchos estudios hacen uso de genes utilizados comúnmente, sin la validación de su expresión estable; esta circunstancia podría dar lugar a conclusiones no fiables (Vandesompele et al. 2002).

❖ 4.3. Estudios de expresión genética en semen

Se han publicado varios trabajos de expresión genética en semen de diferentes especies animales, en los que se emplean como genes de referencia genes usados habitualmente en otros tejidos (Lima et al. 2006; Del Giudice et al. 2010; Jodar et al. 2012; Ganguly et al. 2013; Chen et al. 2014). Sin embargo, son escasos los genes de referencia validados en semen de mamíferos (Cavalcanti et al. 2011 y Amoako et al. 2013 en humano; Chanapiwat et al. 2011 y Zeng et al. 2014 en cerdo; Gong et al. 2014 en ratón). Recientemente como resultado de este estudio, se han validado genes de referencia para estudios de expresión genética en espermatozoides de caballos (Pérez-Rico et al. 2014).

En équidos hay pocos trabajos sobre expresión genética en semen criopreservado. Wrench y col. (2010) tipifican el ARNm de la *ACTB* y *GADPH* para demostrar la inexistencia de ARNm de la *proteína SP22*, aunque no realizan un trabajo de expresión diferencial propiamente dicho. Das y col. (2010) proponen una técnica de extracción de ARN de espermatozoides frescos y congelados no criopreservados donde emplean la *Protamina 2* para demostrar la presencia de ARNm. Este autor realiza un estudio mayor en 2013 de transcriptomas presentes en semen equino fresco, donde utiliza como genes de referencia *ACTB* y *PPIA* (Das et al. 2013). Y posteriormente se comparan niveles de transcriptomas entre espermatozoides de diferente densidad separados por centrifugación, donde se utilizan *GAPDH*, *PRM2* y *MT-RNR2* como genes de referencia (Ing et al. 2014). Por el contrario existen varios trabajos en los que estudian un grupo de genes candidatos para el estudio de la expresión génica en determinadas patologías o grupo de células concretas en caballos (Tabla1).

Tabla 1.- Genes de referencia empleados en estudios de expresión genética en tejidos equinos.

Gen	Referencia
ACTB	(Bogaert et al. 2006; Cappelli et al. 2008; Smits et al. 2009; Zhang, Davis, y Bai 2009; Brooks y Bailey 2010; Beekman et al. 2011; Das et al. 2013)
HPRT1	(Bogaert et al. 2006; Cappelli et al. 2008; Smits et al. 2009; Zhang, Davis, y Bai 2009; Beekman et al. 2011)
B2M	(Bogaert et al. 2006; Cappelli et al. 2008; Zhang, Davis, y Bai 2009)
RPL32	(Bogaert et al. 2006; Cappelli et al. 2008; Smits et al. 2009; Beekman et al. 2011)
GAPDH	(Cappelli et al. 2008; Smits et al. 2009; Zhang, Davis, y Bai 2009; Beekman et al. 2011; Ing et al. 2014)
UBB	(Bogaert et al. 2006; Cappelli et al. 2008; Beekman et al. 2011)
UBC	(Smits et al. 2009)
SDHA	(Cappelli et al. 2008; Smits et al. 2009; Beekman et al. 2011)
R18S	(Cappelli et al. 2008; Zhang, Davis, y Bai 2009)
R28S	(Zhang, Davis, y Bai 2009)
TUBA1	(Bogaert et al. 2006)
TUBA 4A	(Smits et al. 2009)
TFRC	(Cappelli et al. 2008)
CypB	(Bannasch, Tryon, y White 2009)
H2A/1	(Smits et al. 2009)
PRM2	(Ing et al. 2014)
MT-RNR2	(Ing et al. 2014)
PPIA	(Das et al. 2013)

5. Extracción de ARN de semen

El ARN es un material extremadamente sensible y deben tomarse las máximas precauciones para evitar la contaminación con ribonucleasas (ARNsas) y su degradación. Las ARNsas son unas enzimas muy estables y activas que hidrolizan el ARN y no requieren de cofactores para su función. Las ARNsas son muy difíciles de inactivar, soportan el autoclavado y son insensibles a los métodos estándar para la inactivación de proteínas. Es importante trabajar en un ambiente libre de ARNsas, y debe tratarse el material para su eliminación (http://www.ehu.es/SGIker/es/expresion_genica/muestras.php).

El aislamiento del ARN de los espermatozoides presenta un conjunto único de desafíos. Primero, la población celular heterogénea intrínseca en el eyaculado necesita la introducción de una etapa de purificación en la que se aíslan sólo los espermatozoides maduros. Esto es necesario para garantizar la completa ausencia de contaminación de células somáticas y aumentar al máximo la recuperación de espermatozoides viables. En segundo lugar, la pequeña cantidad de ARN presente en estas células (50 fg de ARN /

célula y 0,3 fg de microARN no codificante / célula), requiere la optimización del protocolo de extracción de ARN para maximizar el rendimiento. Y en tercer lugar, la ausencia de marcadores de ARN ribosómico dificulta la evaluación de calidad (Goodrich et al. 2013).

Protocolos de aislamiento de ARN de semen están disponibles para hombre (Goodrich et al. 2007), bovino (Gilbert et al., 2007), porcino (Yang et al., 2009), equino (Das et al., 2010), ratón (Kawano et al. 2012) y aves (Shafeeque et al. 2014).

❖ 5.1. Calidad de las muestras

Uno de los pasos críticos para el éxito de los análisis realizados mediante PCR a Tiempo Real es la calidad de las muestras de ARN. La calidad del ARN se mide en base a cuatro parámetros básicos:

- Concentración: Existen varios métodos de cuantificación para ARN: espectrofotometría (NanoDrop; Thermo Scientific), análisis de microfluidos (Agilent Technologies Bioanalyzer, Bio-Rad Experion Laboratories), electroforesis en gel capilar (QIAxcel de Qiagen), o la detección de tinte fluorescente (Ambion / RiboGreen Applied Biosystems).
- Pureza: La contaminación de las muestras con impurezas orgánicas e inorgánicas (p.ej. fenol, cloroformo), y proteínas afecta de forma significativa la sensibilidad y especificidad del resultado. Para determinar el grado de pureza del ARN se determina la relación de absorbancia A_{260}/A_{280} y A_{260}/A_{230} , que debe ser = 1,8.
- Integridad: Existen dos métodos para determinar el nivel de degradación del ARN:
 - Relación entre las bandas ribosomales 28S y 18S que se observan en un gel de agarosa como bandas discretas y cuya relación 28S/18S en un ARN íntegro es cercano a dos. Se recomienda una relación $28S/18S = 1,2$. No es aplicable al semen pues los espermatozoides no tienen ribosomas.
 - RIN: *RNA Integrity Number*, es un número que aplica el algoritmo del software del Bioanalizador 2100 *Bioanalyzer* de Agilent

Technologies y que es un indicador del grado de degradación de la muestra de ARN. Un ARN intacto tiene un RIN 9-10, mientras que un ARN degradado tendría un RIN <6. Para las aplicaciones de PCR a tiempo Real se recomienda un RIN mínimo de 7, aunque depende del tipo de muestra. Es necesario redefinir el RIN para las muestras de semen.

- Contaminación de ADN genómico: Las técnicas de análisis de expresión génica mediante PCR a tiempo real son técnicas extremadamente sensibles a la contaminación de ADN genómico en la muestra de ARN. La contaminación de ADN puede afectar de forma significativa a la sensibilidad y especificidad del resultado del estudio de expresión génica. El mejor método para evitar la contaminación de ADN genómico es el utilizar un método de extracción que combine la extracción orgánica en fenol y la posterior purificación en columna. Existen kits de purificación en columna que incluyen un pretratamiento en columna con DNasa y posterior elución del ARN. En aquellos casos en los que la muestra contenga un grado de contaminación inaceptable para la aplicación de PCR a tiempo Real con SYBR Green, debe tratarse la muestra con DNasa y repurificar en columna tras el tratamiento. Es muy importante eliminar totalmente la DNasa ya que inactiva la reacción de retrotranscripción requerida en la síntesis de ADNc o ARNc.

Es esencial que todas las muestras del análisis tengan grados de pureza (A260/280) e integridad (28S/18S y/o número RIN) comparables.

Se recomienda el uso de muestras frescas para la obtención del ARN cuando sea posible. En el caso de muestras de semen, éstas pueden ser sometidas a un proceso de adición de crioprotectores antes de congelarlas para mantener su viabilidad. Para la extracción de ARN a partir de tejidos frescos, lo adecuado es congelar el tejido en nitrógeno líquido inmediatamente después de su obtención. El tejido con este procesado puede mantenerse a -80°C hasta la extracción del ARN. En el momento de la extracción, se debe trocear y pesar el tejido sin descongelar, manteniéndolo en hielo seco hasta su homogenización en la solución de lisis. Otra opción para acumular el tejido hasta el

momento de la extracción, es utilizar una solución estabilizadora de ARN como el *RNAlater*[®] de AMBION. Esta opción puede ser la más recomendable con muestras de semen fresco.

Para el análisis de expresión génica es imprescindible el procesamiento en paralelo de las muestras control o referencia y experimentales, siguiendo exactamente el mismo procedimiento para todas.

Las técnicas de PCR a tiempo real son técnicas extremadamente sensibles que requieren de muestras de gran calidad e integridad, libres de impurezas y ADN genómico. Se recomiendan los siguientes métodos de extracción y síntesis de ADN complementario (ADNc):

❖ *5.2. Métodos de extracción de ARN:*

- Para la extracción del ARN a partir de tejidos, incluidas células sanguíneas, se recomienda una combinación de extracción orgánica seguido de una purificación en columna.
- Para células en suspensión o cultivos celulares la extracción con columna suele ser suficiente.

❖ *5.3. Métodos para la síntesis de ADN complementario a partir de ARN total.*

La transcripción inversa, transcripción reversa o retrotranscripción es un proceso de la biología molecular que implica la generación de una cadena de ADNc de doble cadena a partir de ARN. Dicha actividad está mediada por enzimas denominadas transcriptasas inversas o retrotranscriptasas. Para la obtención de ADNc se requiere un oligonucleótido, ya que la retrotranscriptasa necesita un cebador de doble cadena para comenzar a trabajar. Se puede usar un cebador poli-T al que se una la cola poli-A del molde de ARNm o pequeños oligonucleótidos que se unan aleatoriamente en la cadena molde. La retrotranscriptasa va recorriendo la cadena de ARNm y sintetizando la cadena de ADNc complementaria del molde de ARNm (ADNc). El ADNc es susceptible de ser amplificado empleando la técnica de PCR o PCR a tiempo real.

6. Reacción en cadena de la polimerasa (Polimerasa Chain reaction)

La reacción en cadena de la polimerasa o PCR fue desarrollada por Kary Mullis en los años 80 y muy rápidamente llegó a ser una de las técnicas más ampliamente usadas por varias razones de peso: era rápida, económica y simple, aportando el potencial de amplificar copias de ADN procedentes de pequeñas cantidades de material biológico de muy diverso origen e incluso de baja calidad. El nombre de la técnica proviene de la enzima polimerasa de ADN empleada durante la reacción para producir miles o millones de copias de ADN *in vitro*. Cada una de las copias tiene la propiedad de servir de molde para el siguiente ciclo de amplificación, de aquí su nombre de reacción en cadena. Así la secuencia diana original se copia en el primer ciclo, se multiplica por dos en el siguiente ciclo y así sucesivamente, para generar millones de copias después de 30 o 40 ciclos. Los requerimientos de la PCR son básicamente cuatro: ADN molde procedente de la muestra; una enzima polimerasa de ADN, siendo la más común la procedente de una bacteria denominada *Thermus aquaticus* que tiene la propiedad de soportar las fuertes variaciones de temperatura de la reacción sin deteriorarse excesivamente; cebadores, que son una pareja de oligonucleótidos que delimitan la secuencia a amplificar; y los didesoxinucleótidos, que son los que después de pasar del estado trifosfato al monofosfato darán lugar a la secuencia complementaria del ADN diana. Se requiere también un instrumento capaz de calentar y enfriar la reacción en cada ciclo de una manera precisa y un medio adecuado para que la reacción se lleve a cabo.

La PCR convencional requiere que, para detectar el producto amplificado, el tubo de la reacción sea abierto para someterlo a diferentes tipos de pruebas, fundamentalmente electroforesis; esta circunstancia le confiere una gran desventaja, pues los pequeños fragmentos de ADN producidos son susceptibles de formar aerosoles mediante las técnicas de pipeteo y manipulación y contaminar el ambiente, los reactivos e incluso las muestras. Higuchi y col. (1993) publicaron las características de la primera PCR cuantitativa a tiempo real (qPCR) que permite el análisis de los productos amplificados a medida que transcurre la reacción, lo cual representó un salto tecnológico importante; esto se consigue incorporando una serie de fluorocromos que se activan con el producto amplificado y son susceptibles de ser detectados por el propio instrumento donde se desarrolla la reacción,

también se pueden incorporar oligonucleótidos marcados que se hibridan con la secuencia amplificada, añadiendo un grado más de especificidad a la reacción. Además, mediante el uso de muestras de referencia, la qPCR permite inferir la cantidad de partida de dicho ADN.

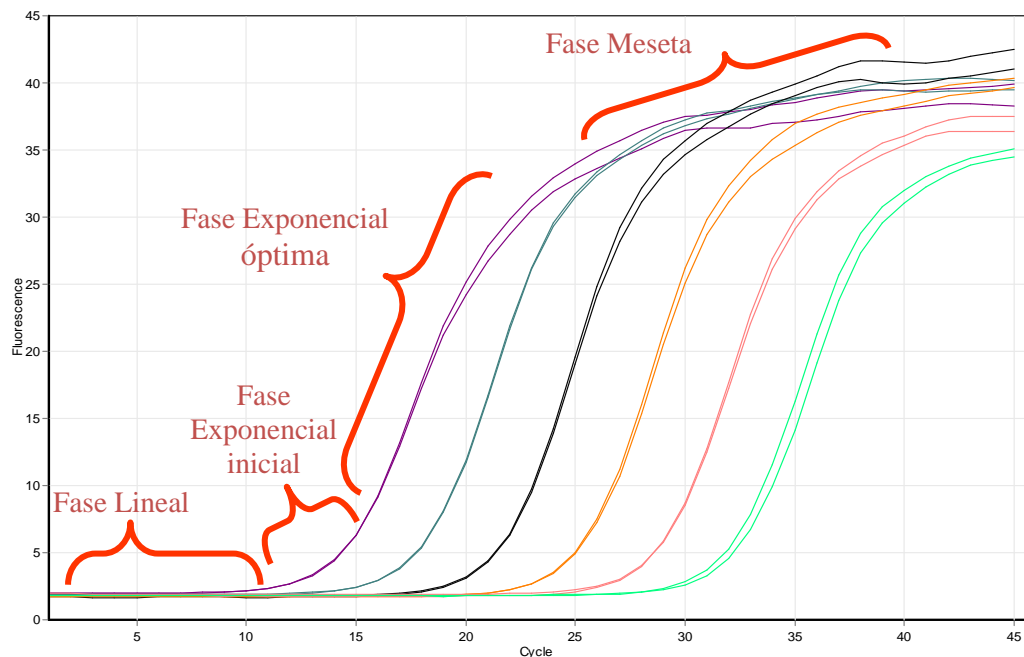
Las polimerasas termoestables de ADN requieren ADN como materia, sin embargo, en ocasiones es necesario detectar la presencia de algún virus cuyo genoma esté constituido por ARN, y otras veces, es muy interesante poder acceder a secuencias de ARN ribosomal altamente conservadas entre especies de microorganismos. En estos casos se recurre a un primer paso denominado retrotranscripción o transcripción inversa, durante el cual el ARN de la muestra es transcrito a ADN. A la retrotranscripción seguida de una PCR se le denomina RT-PCR. En algún momento también se le ha denominado a la PCR en tiempo real RT-PCR (*Real Time PCR*), por esa razón es necesario denominar las dos reacciones de forma diferente, qPCR para la PCR en tiempo real y RT-PCR para la retrotranscripción de ARN seguido de una PCR. De esta manera cuando se emplea una qPCR posterior a una retrotranscripción de ARN en ADN, se puede referir como RT-qPCR para evitar equivocaciones (Stephen A Bustin et al. 2009).

7. La técnica de la PCR cuantitativa (qPCR)

La qPCR pone de manifiesto la cantidad de ADN presente en cada ciclo de amplificación mediante el uso de fluoróforos. Durante la amplificación, la rapidez con que la señal fluorescente alcanza el nivel umbral se correlaciona con la cantidad inicial de ADN molde, permitiendo de esta manera poder cuantificarlo. El número de ciclos necesarios para que la señal fluorescente alcance el nivel umbral, se conoce como *Threshold cycle* (Ct) o ciclo de cuantificación (Cq) y es el parámetro en el cual se fundamenta la cuantificación. A mayor Cq, menor será la cantidad inicial de ADN molde o diana (Figura 1).

En los últimos años, el número de casas comerciales que ofrecen instrumentos y reactivos para qPCR, sumado a la inmensa cantidad de trabajos científicos publicados, ponen en evidencia la importancia de esta tecnología.

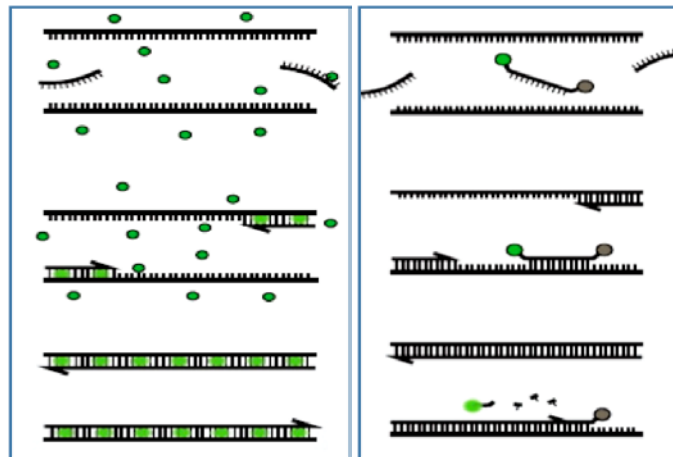
Figura 1.- Representación gráfica de la curva de amplificación en una PCR a tiempo real



Una de las ventajas fundamentales de la qPCR en relación a la PCR tradicional de punto final, es que en la primera las mediciones se realizan en la etapa exponencial de la reacción donde en teoría, por cada ciclo de amplificación se acumula el doble de producto respecto al ciclo anterior, asumiendo una eficiencia del 100%. Por el contrario, en la PCR de punto final la detección del producto de amplificación se realiza en la fase de meseta de la reacción, donde la misma ya se detuvo; por lo tanto, las medidas realizadas en esta fase, no ofrecen resultados fiables en cuanto a la cantidad inicial de ADN molde de la muestra. Otras ventajas de la qPCR son la rapidez en la obtención de resultados, el amplio rango dinámico de cuantificación y la seguridad al evitar la manipulación del producto amplificado.

Dentro de los fluoróforos, el más utilizado es el *SYBR Green I*[®] que tiene la propiedad de unirse al ADN de doble hebra de manera inespecífica, emitiendo hasta 1.000 veces más fluorescencia cuando se encuentra unido al ADN que cuando está libre en solución (absorbe luz de 480 nm de longitud de onda y emite a 520 nm). Por lo tanto, el incremento de la señal de fluorescencia es proporcional a la cantidad de ADN de doble hebra presente en el tubo de reacción. Esta señal se mide al final de la fase de extensión de la PCR (Figura 2).

Figura 2.- Esquema de fluoróforo intercalante y sonda.



Izquierda: el fluoróforo emite luz visible al intercalarse en la hebra de ADN de doble cadena cuando se excita con una luz de longitud de onda adecuada. Derecha: la sonda marcada con un fluoróforo y un inhibidor, el fluoróforo es susceptible de emitir luz cuando la sonda se hidroliza y se separa del inhibidor.

La principal limitación de estos marcadores es que al unirse al total de ácidos nucleicos en la reacción de la PCR, emiten una señal luminosa tanto para productos específicos como para aquellos que no lo son (dímeros). Para hacer frente a esta situación se debe realizar un análisis de los resultados en la curva de fusión. Este análisis permite que los productos no específicos puedan ser discriminados de los amplicones específicos (Ririe, Rasmussen, y Wittwer 1997).

Por otra parte, están los sistemas de identificación basados en oligonucleótidos fluorescentes. Básicamente se encuentran marcados con dos fluorocromos (reporter y quencher) que interfieren entre sí mientras están próximos, de forma que mediante hidrólisis o hibridación se separan o se juntan ambos y uno de ellos emite luz a una determinada longitud de onda detectable con el instrumento adecuado (Figura 2). Hay varios sistemas basados en sondas fluorescentes, los más conocidos son: *TaqMan® probes*, *Molecular Beacons®*, *Hybridization probes*, *Locked Nucleic Acid (LNA) probes*, *LightUp probes*, etc. En cada caso, múltiples colorantes fluorescentes (ej. *Fluorescein*, *6-FAM*, *JOE*, *VIC*, *Cal Fluor*, etc.), pueden ser utilizados con una variedad de inhibidores (ej. *TAMRA*, *DABCYL*, *BHQ*, etc.).

Es importante, cuando se diseña el sistema de amplificación a utilizar, tener en cuenta las ventajas y desventajas que presentan las diferentes opciones descritas. Utilizando sistemas basados en sondas fluorescentes, se suma la posibilidad de llevar a

cabo reacciones multiplex, que tanta relevancia tienen a nivel diagnóstico por su rapidez y economía. Sin embargo, este enfoque necesita de un diseño de secuencias específicas para su uso como sondas, y por consiguiente, es más laborioso y costoso (Lee et al. 2004), aunque en muchos casos es la de elección por su alta especificidad.

Hay una amplia variedad de equipos adecuados para qPCR, que consisten en un termociclador para realizar la reacción y una parte óptica. La química elegida y el equipo están íntimamente relacionados. Hay tres formas básicas en que los instrumentos pueden aportar la energía de excitación para los fluoróforos: mediante lámparas, diodos o láser, combinados con distintos tipos de fotodetectores para medir la fluorescencia emitida. Además es imprescindible el empleo de un ordenador que posea un software apropiado para la recolección y análisis de los datos generados. Las curvas de amplificación generadas por dicho software determinan el número de ciclo en el cual la fluorescencia alcanza el valor umbral (Cq). Este valor de Cq es inversamente proporcional a la cantidad inicial de la secuencia específica del ADN a cuantificar en la muestra original. A partir del mismo, el software realiza los cálculos de cuantificación.

8. Análisis de la curva de fusión

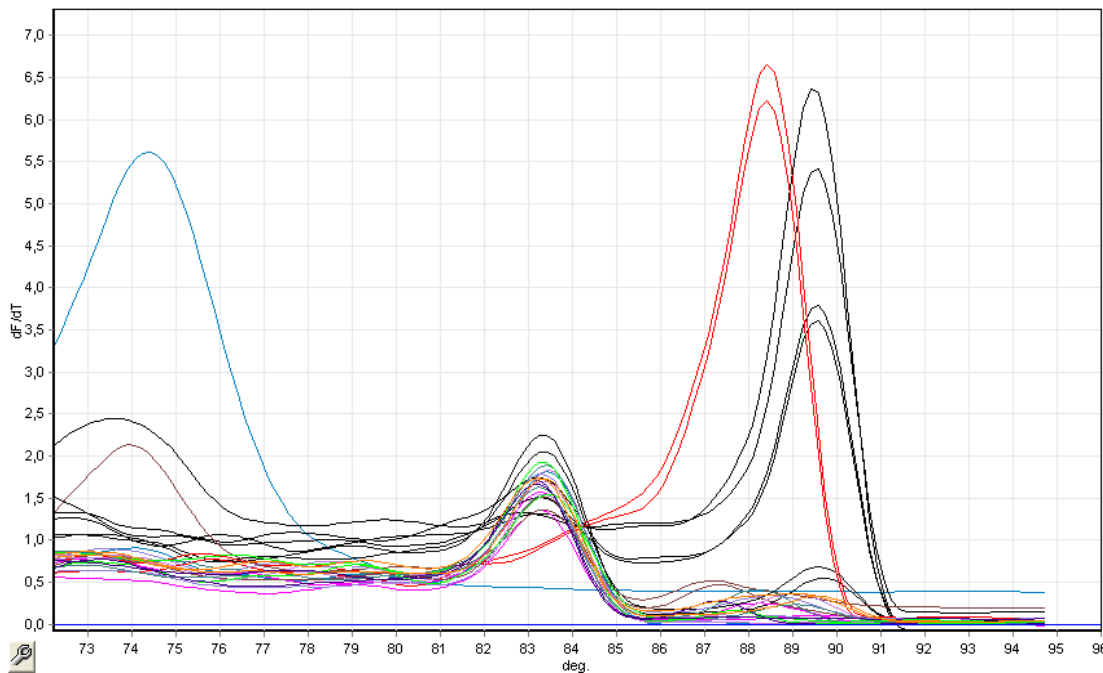
Mediante el uso de fluoróforos intercalantes como el *SYBR*® *Green* es posible identificar productos específicos de la PCR mediante el análisis de la temperatura de fusión que se expresa en una curva cuya forma se relaciona con el contenido de GC, tamaño de los amplicones y la secuencia de los mismos (Ririe, Rasmussen, y Wittwer 1997).

El análisis de la curva de fusión puede llevarse a cabo en la mayoría de plataformas disponibles para la qPCR, por lo general, al final de la reacción de amplificación. La medida de la fluorescencia dependiente de la temperatura se realiza mientras la temperatura en el termociclador aumenta alrededor de 50°C a 95°C, siendo la fluorescencia detectada dependiente de la presencia de secuencias de doble cadena de ADN o ADNc (Giglio et al. 2003; Lee et al. 2004).

Cuando las dobles cadenas de ADN o ADNc se separan por efectos de la temperatura, la fluorescencia disminuye porque el intercalante deja de estar unido al producto de la PCR. La mayoría de los instrumentos proporcionan un análisis de estos datos teniendo en cuenta

el punto en donde aparece el primer diferencial negativo de la señal de fluorescencia con respecto a la temperatura y la temperatura de fusión (Figura 3). Este punto aparece como uno o más picos que representan las temperaturas a las que los máximos niveles de cambio de la fluorescencia se producen, correspondiendo estos a un producto particular en la PCR (Lee et al. 2004).

Figura 3.- Análisis de la curva de fusión.



Los picos de las curvas muestran que los productos específicos de la PCR en tiempo real tienen una temperatura de fusión mayor (83,2°C, 88,4°C y 89,5°C) a la de productos inespecíficos (74°C).

Para discriminar los productos específicos de la PCR es necesario saber que estos se disocian a una temperatura más alta que los artefactos como dímeros (Ririe *et al.*, 1997).

Vale la pena tener en cuenta que el método de análisis de la curva de fusión es análogo al de electroforesis en gel de agarosa (Giglio, Monis, y Saint 2003). Con ambos métodos se puede evidenciar la presencia de productos no específicos, sin embargo también están expuestos a errores. Estos casos ocurren cuando las masas moleculares de los productos de la PCR en cuestión son similares. Adicionalmente, la exactitud de estos datos depende también de las plataformas de hardware utilizadas (Lee et al. 2004).

9. Ciclo de cuantificación (Quantification cycle)

Los resultados de la PCR en tiempo real se basan en la detección y cuantificación de los marcadores fluorescentes a lo largo de la reacción de la PCR. Esto permite conocer la cantidad de fluorescencia emitida durante la fase exponencial de la reacción, donde un aumento significativo del producto de la PCR se correlaciona con la cantidad inicial de ADN o ADNc en estudio (Walker 2002).

Para obtener estos resultados, los valores de cuantificación de ciclo (Cq) son determinados por la identificación del ciclo en el cual la emisión de la intensidad del marcador fluorescente se eleva por encima del ruido de fondo en la fase exponencial de la reacción de la PCR. En otras palabras, el valor Cq está representado por el ciclo en el cual la producción de fluorescencia cruza el umbral establecido (Bustin 2005).

Es importante considerar que un valor Cq superior a 40 ciclos indica que hay una amplificación muy poco eficiente, y por consiguiente no deben incluirse en los cálculos. En la actualidad hay softwares que pueden determinar valores Cq mediante un análisis matemático de la curva de amplificación pudiendo tener así una mejor reproducibilidad en las pruebas de PCR en tiempo real (Dorak 2008). Los números de ciclo en los cuales la curva de fluorescencia atraviesa el umbral establecido, corresponden a los valores Cq que se utilizarán en cálculos posteriores.

Para obtener resultados fiables en las pruebas realizadas con la PCR en tiempo real es necesario optimizar la reacción en el laboratorio. La optimización consiste en hacer que las variaciones normales de la prueba no causen efectos importantes en los valores Cq y que tengan un impacto mínimo en la cantidad de fluorescencia observada. Los criterios más importantes para la optimización son especificidad, sensibilidad, eficiencia y reproducibilidad de la qPCR (Edwards 2004).

Los factores que deben ser optimizados son las mezclas maestras de reactivos y las concentraciones de los cebadores, marcadores fluorescentes y muestra. Las mejores concentraciones de reactivos y condiciones de la PCR son aquellas en las que se observan resultados óptimos en términos de la curva de fusión y de la eficiencia de la amplificación en reacciones llevadas a cabo con controles positivos o calibradores (Edwards, 2004).

También es útil realizar electroforesis en gel de agarosa cuando se optimiza una qPCR (<http://www.monografias.com/trabajos64/pcr-tiempo-real/pcr-tiempo-real.shtml>). Los resultados de este análisis proporcionan datos para relacionar la longitud del producto con los picos del análisis de la curva de fusión y la posible presencia de artefactos como dímeros (Dussault y Pouliot 2006).

10. Estrategias para la cuantificación de ARNm en qPCR

Comúnmente se emplean dos estrategias para llevar a cabo la cuantificación de la expresión genética con PCR en tiempo real. Estas estrategias son: cuantificación absoluta y cuantificación relativa.

❖ 10.1. Cuantificación absoluta

La técnica de cuantificación absoluta relaciona la señal obtenida con la PCR en tiempo real al número de copias fijo de una secuencia estándar utilizando una curva de calibración. Las curvas de calibración son altamente reproducibles y permiten la generación de datos específicos y sensibles. Sin embargo el modelo de curvas de calibración externas tiene que ser rigurosamente validado con absoluta exactitud pues la cuantificación de la expresión genética en la PCR en tiempo real depende exclusivamente de la precisión de los estándares empleados (Pfaffl 2008).

Además, el diseño de secuencias estándar, su producción y la determinación exacta de sus concentraciones, así como su estabilidad a largo plazo y su almacenamiento, son factores complejos y puede presentar algunos problemas (Pfaffl 2004). Estas consideraciones hacen de la cuantificación absoluta un procedimiento laborioso, costoso y que no siempre puede llevarse a cabo en todos los laboratorios.

❖ 10.2. Cuantificación relativa

La cuantificación relativa no requiere estándares con concentraciones determinadas. Esta técnica se utiliza para obtener la magnitud de los cambios fisiológicos en los niveles de expresión genética de un gen en estudio en comparación con uno o más genes de referencia (Pfaffl 2004). Hay que tener en cuenta que la expresión de los genes de referencia debe ser constante en las células estudiadas. Por esto, las secuencias utilizadas para cuantificación relativa son generalmente genes que regulan funciones estructurales o

muy básicas relacionadas con el metabolismo celular y que no se ven influidos por el estado funcional de la célula. Inicialmente se les denominó "housekeeping" (Ambion Biosystems 2008).

Los cálculos en cuantificación relativa de expresión genética se basan en la comparación de los valores Cq utilizando la eficiencia de la reacción de la PCR como factor de corrección. Sin embargo, hay un modelo que no requiere la eficiencia de la reacción para acceder a un factor de corrección. Este modelo supone una eficiencia óptima e idéntica (correspondiente al 100%) en la eficiencia de reacción en las PCR en tiempo real tanto del gen en estudio como del gen de referencia (Livak y Schmittgen 2001). Este es el método 2 delta-delta Cq que sólo es aplicable para una estimación rápida de la proporción relativa de la expresión genética en estudio (Pfaffl 2001). El método 2 delta-delta Cq expresa la proporción obtenida de la relación entre los valores Cq de la muestra y los valores Cq del control tal y como se muestra en la siguiente ecuación:

$$Ratio = 2^{-(\Delta Cq \text{ muestra} - \Delta Cq \text{ referencia})} \Rightarrow ratio = 2^{-\Delta \Delta Cq}$$

Otro modelo para cuantificación relativa ha sido publicado por Pfaffl (2001). En este modelo las diferentes eficiencias de la PCR tanto para los genes en estudio como para los genes de referencia se toman en cuenta como se muestra en la siguiente ecuación:

$$Ratio = E \text{ muestra}^{\Delta Cq \text{ gen (control-muestra)}} / E \text{ ref}^{\Delta Cq \text{ gen (control-muestra)}}$$

En esta ecuación la proporción o ratio del gen en estudio se expresa en una muestra (ej. Individuos sometidos a un tratamiento, o células en un estado fisiológico determinado, etc.) frente a un control (ej. Individuos sin tratar o células en un estado fisiológico normal, etc.) en comparación con un gen de referencia. *E muestra* representa la eficiencia de la PCR en tiempo real de la muestra en estudio; *E ref* representa la eficiencia de la PCR en tiempo real del gen de referencia; $\Delta Cq \text{ gen}$ es la desviación en Cq del control menos la muestra del gen en estudio; y $\Delta Cq \text{ ref}$ es la desviación en Cq del control menos la muestra del gen de referencia. En este modelo también es necesario conocer la eficiencia de PCR de cada gen estudiado. Las eficiencias de la PCR en tiempo real se calculan a partir de las pendientes de la curva estándar obtenidas después de realizar diluciones seriadas con las reacciones de la PCR en tiempo real (Pfaffl 2004) de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$E = 10^{[-1/\text{pendiente}]}$$

Es importante mencionar que la eficiencia de la PCR en tiempo real es la capacidad de la reacción de duplicar el número de copias de las cadenas de ADN o ADNc en cada ciclo (Bustin & Nolan 2004).

Se ha observado que la cuantificación relativa de ARNm tiene algunas limitaciones. En primer lugar, se puede introducir un sesgo estadístico importante cuando hay grandes diferencias en los niveles de expresión del gen en estudio y del gen de referencia, lo que puede conducir a una interpretación biológica equivocada; y en segundo lugar, es difícil encontrar genes de referencia adecuados (Bustin et al. 2005). Por estas razones es recomendable la utilización de más de un gen de referencia con el fin de tener datos fiables en la investigación (Bustin & Nolan 2004), en concreto con el programa *GENORM* se recomienda el uso de tres genes de referencia.

11. Genes de referencia

Algunos de los genes de referencia más utilizados incluyen: *β -actina*, *Glyceraldehydo 3-fosfato deshidrogenasa*, *hipoxantina guanina phosphoribosyl-transferasa* y *18S del ARN ribosomal* (Huggett et al. 2005).

La elección correcta de los genes de referencia para la normalización de PCR en tiempo real es esencial para reflejar datos fiables sobre los procesos biológicos de las proteínas objeto de estudio (Robinson, Sutherland, y Sutherland 2007). Además se ha demostrado que el uso de un solo gen como gen de referencia es susceptible a tener errores en la interpretación de los resultados de la qPCR (Lee et al. 2002). En consecuencia, para normalizar las expresiones de genes cuando se trabaja con qPCR, es necesario utilizar más de un gen de referencia, sobre todo cuando no se puede encontrar un único gen de referencia con características óptimas para realizar cuantificación relativa (Huggett et al. 2005; Robinson et al. 2007)

Actualmente existen varios programas informáticos adecuados para realizar el análisis de la idoneidad de genes de referencia para cada experimento que se realice y pueden ser encontrados de forma libre en internet como por ejemplo *NORMFINDER* (Andersen, Jensen, y Ørntoft 2004), *BESTKEEPER* (Pfaffl et al. 2004), *GENORM* y *REST* (*Relative Expression Software Tool*) (Pfaffl et al. 2002).

12. Análisis estadístico

❖ *12.1. NORMFINDER*

Es un software de libre disposición, que calcula automáticamente el valor de la estabilidad de todos los genes de referencia candidatos a prueba (Andersen, Jensen, y Ørntoft 2004). El valor de la estabilidad se basa en la estimación combinada de variaciones de expresión intra e intergrupales de los genes estudiados. Un bajo valor de estabilidad es indicativo de una baja variación combinada entre y dentro de grupos, lo cual demuestra una alta estabilidad de la expresión (Ohl et al. 2005).

Clasifica los genes en función de la varianza de su expresión entre y dentro de tratamientos, requiere la utilización de dos grupos en el análisis. La varianza entre grupos se estima por las diferencias en los niveles de expresión de éstos, asumiendo que el promedio de expresión de los genes es independiente del grupo y que el promedio de las variaciones entre grupos es cero. Esta última suposición requiere que se seleccionen los genes candidatos de un grupo del que *a priori* no se esperen diferencias de expresión entre grupos, lo cual es una incógnita en los casos donde se estudia la expresión de genes bajo nuevas circunstancias. Estas restricciones no son realistas y restan flexibilidad al modelo, en el que la interacción entre genes y el ambiente se suponen parte de los mecanismos de regulación de la expresión génica (http://www.mdl.dk/Files/Normfinder_documentation_v19.pdf).

❖ *12.2. BESTKEEPER*

Es una aplicación de hoja de cálculo. Sirve para determina los mejores genes de referencia o ver los niveles de expresión de genes de interés analizando un máximo de 10 genes a través de un índice. Para el procesamiento de datos se tienen en cuenta los puntos de cruce (CP). Para analizar la estabilidad de la expresión de los genes candidatos a genes de referencia, se realiza una estadística descriptiva con los CP: media geométrica (GM), media aritmética, valor mínimo y máximo, desviación estándar y coeficiente de variación. Estos resultados se corrigen con el valor de la eficiencia de la qPCR. Con los datos de la estadística descriptiva se puede hacer una primera estimación de la estabilidad inspeccionando los valores de desviación estándar (SD) y coeficiente de variación (CV).

Según la variación observada, se pueden ordenar del nivel de expresión más estable, que muestra la menor variación, al menos estable, con la variación mayor. Cualquier gen con $SD > 1$ puede considerarse inadecuado como gen de referencia. De aquellos genes considerados con una expresión estable, se calcula el *Índice BestKeeper* para cada muestra como la media geométrica de los CP de este gen candidato (ecuación *BestKeeper Index*), donde z es el número total de genes candidatos incluidos

$$BestKeeper Index = \sqrt[z]{CP1 \times CP2 \times CP3 \times \dots \times CPz}$$

Y posteriormente, para estimar las relaciones entre todas las posibles parejas de genes candidatos, se realizan numerosos análisis de correlación, utilizando el coeficiente de correlación de Pearson, obteniendo un valor p de significación. Todos esos genes altamente correlacionados se combinan en el Índice Bestkeeper. Por último se calcula la correlación entre cada gen candidato con el índice, para describir la relación que hay entre ambos y la contribución del gen candidato en el índice, mediante el coeficiente de correlación de Pearson y el coeficiente de determinación, con sus respectivos valores p . Serán adecuados aquellos genes con valores significativos. (Pfaffl et al. 2004; <http://www.gene-quantification.de/bestkeeper.html>)

❖ 12.3. *GENORM v 2002*

Es una aplicación de hoja de cálculo. El algoritmo *GENORM* realiza básicamente dos análisis: uno de evaluación de la estabilidad en la expresión de los genes seleccionados y otro que valora la conveniencia de emplear múltiples genes normalizadores (Vandesompele et al., 2002).

- Valores M de estabilidad de expresión

Con el objeto de cuantificar la estabilidad de cada gen, el algoritmo empleado se fundamenta en que el ratio de expresión de dos genes internos debe ser por definición idéntico en todas las muestras, independientemente de las condiciones ambientales o del tipo celular. Por esta razón, una variación en los ratios de expresión refleja que al menos uno, o bien los dos, no está siendo expresado de forma constante, por lo que su estabilidad es menor. Siguiendo este planteamiento, el algoritmo determina la variación de cada gen control comparándolo a pares con los valores de los otros genes; esta comparación se traduce en la desviación típica del ratio de expresión transformado logarítmicamente. Finalmente, se define el valor M de estabilidad del gen normalizador como la variación de

la media de pares de un gen particular frente a todos los otros genes normalizadores. De este modo, existe una relación inversa entre la estabilidad y el valor M . Además, el algoritmo cuantifica el error sistemático sufrido durante las repeticiones técnicas, es decir, aquéllas diferencias en las datos de expresión para el mismo gen y bajo las mismas condiciones de qPCR; este error es debido a las variaciones inherentes a la máquina, a las enzimas empleadas o al pipeteo.

- Determinación del número óptimo de genes normalizadores

Se ha descrito que es preciso emplear múltiples genes normalizadores a fin de realizar una valoración reproducible de la expresión relativa de uno o más genes. Por ello, es preciso desarrollar un factor de normalizador que dependa de los niveles de expresión de los genes normalizadores con una mayor estabilidad; la aproximación de *GENORM* a este enfoque incluye el empleo de la media geométrica de los valores de estabilidad de los distintos genes control empleados. Un aspecto crucial es definir qué número de genes normalizadores es preciso para cada experimento; evidentemente, debe existir un equilibrio entre la exactitud y las consideraciones de tipo práctico. Por ello, se recomienda emplear un número mínimo de tres genes normalizadores (los más estables) y añadir otros nuevos hasta que la inclusión de éstos no contribuya significativamente a la modificación del factor de normalización. Esta inclusión se computa como la variación del factor de normalización con n genes (donde $n \geq 3$) respecto del equivalente para $n + 1$ genes (es decir, de nuevo el análisis de variación a pares) para todas las muestras en el mismo grupo de tejidos u órganos. Una vez determinados los valores de variación a pares (PV, del inglés *pairwise variation*) obtenidos mediante la comparación antes mencionada, es preciso establecer un umbral por debajo del cual la adición de más genes normalizadores no es necesaria. Este valor depende de los datos en concreto, pero suele aceptarse 0,15 como umbral adecuado (Vandesompele et al. 2002; Mallona González 2008).

❖ *12.4. REST 2009*

REST 2009 es un paquete de software para el análisis de expresión génica utilizando datos de amplificación en tiempo real (<http://www.REST.de.com>). Es una herramienta para estimar la regulación por encima o por debajo en estudios de expresión génica. Se aplica un modelo matemático que tiene en cuenta las diferentes eficiencias de PCR de los genes

de interés y de referencia. Utiliza múltiples genes de referencia para la normalización pudiendo mejorar la fiabilidad de los resultados.

La cuantificación relativa tradicional permite que la expresión génica pueda ser estimada, pero no puede proporcionar información estadística adecuada para comparar la expresión de los grupos de muestras tratadas y no tratadas de una manera sólida. La incorporación de la asignación al azar integrado y métodos *bootstrapping* utilizados en *REST*, prueba la significación estadística de los ratios de expresión calculados y se puede utilizar incluso cuando están presentes valores atípicos en los datos (http://www.gene-quantification.de/REST_2009_Software_User_Guide.pdf).

Materiales y métodos

1. Muestras

Las muestras empleadas en este estudio son pajuelas de semen congelado procedente de veintiún sementales de fertilidad normal, que pertenecen al banco de germoplasma del Servicio de Cría Caballar de las Fuerzas Armadas.

Para la realización del estudio se emplean tres pajuelas del mismo lote de congelación por animal. Las pajuelas de semen congelado han estado almacenadas en nitrógeno líquido un periodo superior a 12 meses. El proceso de descongelación se realiza a 37°C durante 30 segundos en un baño termostatizado.

En su momento, los eyaculados fueron recogidos mediante el uso de vagina artificial (Modelo *Missouri*), congelados utilizando como diluyente INRA 96® modificado, suplementado con 2% de yema de huevo y 2.5% de glicerol, y envasados en pajuelas francesas de 0,5 ml (IMV technologies) para su congelación en nitrógeno líquido (-196°C).

Una muestra se utiliza para la realización de un análisis computerizado de parámetros de calidad seminal postdescongelación mediante un sistema CASA (Microptic SL, Barcelona, España) en el Centro Militar de Cría Caballar de Écija (tabla 2).

Con una segunda muestra se realiza, en el Centro Militar de Cría Caballar de Ávila, un estudio de la dinámica de fragmentación del ADN de los espermatozoides a las 0, 4 y 6 horas postdescongelación (tabla 2).

La tercera muestra se utiliza para realizar el estudio de expresión genética en el Laboratorio de Investigación Aplicada de Córdoba. Esta muestra requiere un paso previo de purificación de espermatozoides para seleccionar el tipo celular sobre el que se va a trabajar. Para separar los espermatozoides maduros de los inmaduros y de las células somáticas, las muestras de semen son centrifugadas en gradiente discontinuo a través de una solución del 40% de partículas de sílice silanizado, como exponen en sus trabajos Das (2010) y Varner (2008) (Protocolo 1). A continuación se determina la concentración de espermatozoides purificados de las muestras con una cámara de recuento modelo *Neubauer* (*Hausser Scientific*, Horsham PA, EE.UU).

Protocolo 1. Purificación de espermatozoides con Equipure.

Material

- *Top Layer*[®] de *EQUIPURE*
- PBS (NaCl 124 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, y KH₂PO₄ 3 mM)

Método

- Mezclar 500 µl de semen (una pajuela) con 1,5 ml de *Top Layer*[®]
- Centrifugar a 11.000 g durante 15 segundos y eliminar el sobrenadante.
- Lavar con 1 ml de PBS.
- Centrifugar a 11.000 g durante 15 segundos.
- Eliminar el sobrenadante y resuspender el botón celular en 50 µl de PBS.

Tabla 2.- Parámetros de calidad seminal

Individuo	Estáticos (%)	PMOT (%)	VCL (%)	VSL (%)	VAP (%)	LIN (%)	STR (%)	WOB (%)	ALH (%)	BCF (%)	Fragmentación 0 h (%)	Fragmentación 4 h (%)	Fragmentación 6 h (%)
1	51,8	14,5	57,8	26,5	37,7	45,7	72,6	-	1,9	3,6	36	32	59
2	15,2	22,9	76,6	29,4	45,8	38,5	64,3	59,8	3,6	8,5	13	28	45
3	62	21,9	86,8	50,9	63,1	58,7	80,8	72,7	3,1	9,7	51	80	100
4	26,8	30,4	65,2	37,3	47,8	57,3	78,1	73,3	2,6	8,5	5	4	12
5	64,1	11,6	56,3	26,1	35,6	46,4	73,5	63,1	3,1	8,8	4	6	9
6	39,1	36,9	93,1	52,2	64,5	56,1	80,9	69,3	3,3	10,6	1	3	23
7	30,8	15	70,5	25,7	41,7	36,5	61,7	59,1	3,7	6,8	17	25	23
8	4,7	32	87,5	37,2	56,9	42,6	65,4	65,1	3,5	8,5	14	32	36
9	55,9	16,3	50,6	30,7	38	60,7	80,9	75	2,1	7,9	4	6	20
10	15,8	36,5	72,5	36	49,7	49,6	72,4	68,6	2,9	8,5	6	10	12
11	38,2	14,8	46	23,6	32,1	51,3	73,4	69,9	2,8	8,3	18	30	40
12	56,8	8,9	47,1	21,3	30,1	45,3	70,9	63,8	3,3	7,3	5	11	26
13	16,9	20,1	62,8	26,7	41,1	40	61,4	-	4,1	9,2	15	32	43
14	32,2	32,6	86,6	44,5	59,6	51,4	74,8	68,8	3,3	9,4	7,2	8,3	27
15	19,1	29,1	82,7	32,3	49,1	39,1	65,9	59,3	3,4	9	6	58	76
16	38,6	22,3	62,9	28,5	41,1	45	69,8	-	2,8	8,3	4	6	20
17	12,4	30,9	71,7	34	49,7	47,4	68,4	69,3	2,8	7,5	4	14	17
18	26,2	29,1	69,3	35,8	48,8	51,7	73,4	70,5	2,9	7,9	7	22	32
19	40,9	17,9	68	29	42,7	42,7	68	62,8	3,2	7,5	8	11	20
20	28,3	18,7	88,4	26,9	44,2	30,4	60,9	50	4,3	9,2	21	36	37
21	48,3	24,2	73,9	45,6	56,8	61,7	80,3	76,8	2,5	8,6	11	46	53

2. Selección de genes de referencia y diseño de cebadores

Se seleccionan nueve genes candidatos a genes de referencia, siete de los cuales han sido utilizados habitualmente como genes de referencia: *beta-actina* (*ACTB*), *ATP sintasa subunidad b* (*ATP5b*), *gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa* (*GAPDH*), *proteína de choque térmico* (*HSP90*), *proteína ribosomal L32* (*RPL32*), *succinato deshidrogenasa* (*SDHA*) y *ubiquitina* (*UBQ*); y dos genes de gran importancia en el empaquetamiento de la cromatina: *histona 2 variante A1* (*H2AI*) y *protamina 1* (*PRM1*).

Algunos cebadores específicos de caballos se obtienen a partir de secuencias publicadas, *ACTB* y *H2AI* de Smits (2009) y *GAPDH* de Beekman (2011); para el resto de genes, las secuencias de ARNm y ADNg se buscan en la base de datos del genoma del caballo (Recursos Genómicos de caballos <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/genome/guide/horse/>). Para el diseño de los cebadores se usa el programa *Primer3 Plus* (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>) en *ATP5B*, *HSP90*, *PRM1* y *SDHA*, en los que los cebadores hibridan en exones diferentes, o el *PerlPrimer v1.1.17* (Pfaffl et al. 2002; Marshall 2004) en *RPL32* y *UBQ*, para el diseño de cebadores adecuados para qPCR que sean específicos de ARNm como son los *intron-spanning*, en los que uno de los cebadores hibrida sobre la unión de dos exones. La especificidad de la secuencia de los cebadores se confirma por análisis con BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) contra el genoma del caballo publicado en el *National Center for Biotechnology Information* (NCBI).

Posteriormente, para la validación de los cebadores se estudia la pureza del producto de PCR, que se basa en la altura de un pico único y limpio de su curva de fusión y un Cq temprano durante la qPCR. Una vez optimizada la reacción, el producto de la qPCR de cada par de cebadores se somete a electroforesis en gel de agarosa al 2%, con un marcador molecular de ADN (*CentiMark PCR Marker*, *Vivantis*). Y por último, los productos son secuenciados con sus respectivos cebadores. La especificidad se valida mediante la comparación de estas secuencias con las de la base de datos genómica del caballo presente en el NCBI.

Adicionalmente, se comprueba la inexistencia de ADN genómico (ADNg) contaminante mediante la realización de una qPCR con las muestras de ARN, utilizando cebadores de *ACTB* que pueden amplificar ADNg si estuviese presente en la muestra, ya que el amplicón tiene un número de bases diferente al ADNc y nos permite diferenciarlo.

Tabla 3.- Genes de referencia candidatos y las secuencias de los cebadores.

Nombre del gen	Símbolo	pb (ADNc)	Cebadores 5' → 3'	Origen	Número de acceso
<i>Beta-actina</i>	<i>ACTB</i>	88	CCAGCACGATGAAGATCAAG GTGGACAATGAGGCCAGAAT	Smits 2009	AF035774
<i>ATP sintasa subunidad beta</i>	<i>ATP5B</i>	168	TGGGGTGCAAAAGATCCTAC GAGTTGTTACAGGCCATTT	Este trabajo	NM_001195525
<i>Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa</i>	<i>GAPDH</i>	106	GGTGAAGGTCGGAGTAAACG AATGAAGGGATCATTGATGG	Beekman 2011	AF083897
<i>Histona H2A tipo 1</i>	<i>H2AI</i>	105	ATATTCAGGCCGTGCTGCT TTTGGGTTTCAAAGCGTTTC	Smits 2009	XM_001497311.2
<i>Proteína de choque térmico 90</i>	<i>HSP90</i>	185	AGCAAGGCCAAGTTTGAGAA ATTGTGGAGTTGTCCGAAG	Este trabajo	HQ890170
<i>Protamina 1</i>	<i>PRM1</i>	125	AGCCAGAGCCAGAGCAGAT CGTCTTCTCCTACACCTCAGGA	Este trabajo	L10654
<i>Proteína ribosomal L32 *</i>	<i>RPL32</i>	181	GGAAACCCAGAGGCATTGAC CAGTACGATTTGTTGCACATG	Este trabajo	XM_001501497.3
<i>Succinato deshidrogenasa subunidad A</i>	<i>SDHA</i>	159	TCCATCGCATAAGAGCAAAG GGTGGAACTGAACGAACTCC	Este trabajo	DQ402987.1
<i>Ubiquitina B*</i>	<i>UBQ</i>	166	GAACGTCAAGGCCAAGATCC AAATCTGCATACCRCTCTC	Este trabajo	NM_001081862.1

*Cebadores con diseño intron-spanning

3. Extracción de ARN y RT-qPCR

Para la obtención del ARN mensajero de espermatozoides se utiliza un kit comercial, que consiste en una extracción orgánica seguida de la purificación en columna según las instrucciones del fabricante (Protocolo 2), éste protocolo incluye una digestión con DNasa I en la columna y adicionalmente se realiza una segunda digestión después de la extracción (Protocolo 3).

Protocolo 2.- Extracción de ARN con columnas

Material

- Reactivo *TRIstore*TM de *BIOLINE*
- Etanol absoluto
- *Direct-zol*TM *RNA MiniPrep* de *ZYMO RESEARCH*
- Incubadora
- Tubos eppendorf
- Agua libre de RNasas

Método

- Añadir 1 ml de reactivo *TRIstore* a una muestra de 25-50 µl (20 millones de espermatozoides).
- Agitar con vortex e incubar 5 minutos a temperatura ambiente.

- Centrifugar a 12000 g durante 1 minuto y transferir sobrenadante a un nuevo microtubo.
- Añadir 600 μ l de etanol absoluto y agitar con vortex.
- Transferir a la columna denominada *Zymo-Spin IIC* y centrifugar 1 minuto a 12000 g.
- Descartar el filtrado y el tubo, y poner la columna en un nuevo tubo.
- Añadir 400 μ l de *RNA Wash buffer* en la columna y centrifugar a 12.000 g durante 1 minuto, descartar el filtrado y colocar de nuevo la columna en el tubo.
- Se prepara una mezcla con 5 μ l de *DNase I*, 8 μ l de *10x DNase reaction Buffer*, 3 μ l de agua libre de RNAsas, y 64 μ l de *RNA Wash buffer*. Añadir los 80 μ l de la mezcla DNasa en la columna.
- Incubar la columna a 25-37 °C durante 15 minutos.
- Centrifugar a 12000 g durante 30 segundos.
- Añadir 400 μ l de *RNA Prewash buffer* y centrifugar 1 minuto a 12.000 g. Descartar el filtrado y repetir éste paso.
- Añadir 700 μ l de *RNA Wash buffer* en la columna y centrifugar 1 minuto a 12000 g y desechar el filtrado.
- Centrifugar a 12000 g durante 2 minutos y transferir la columna a un tubo eppendorf.
- Añadir 50 μ l de agua libre de RNAsas.
- Incubar 1 minuto a temperatura ambiente y centrifugar a máxima velocidad 1 minuto. Repetir este paso.
- Congelar la muestra.

Protocolo 3.- Digestión con DNasa I

Material

- Microtubo de 0,2 ml
- *DNase I, Amplification Grade* de SIGMA-ALDRICH®
- Agua libre de RNAsas
- Incubadora

Método

- Mezclar en un microtubo 8 μ l de muestra de ARN, 1 μ l de reactivo 10x y 1 μ l de *DNase I*.
- Incubación a temperatura ambiente durante 15 minutos.
- Añadir 1 μ l de reactivo *Stop*.
- Incubar 10 minutos a 70 °C.

La cantidad de ARN recuperado de los espermatozoides se cuantifica mediante espectrofotometría a la absorbancia de 260 nm (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, EE.UU).

Se lleva a cabo una retrotranscripción y amplificación en un paso, mediante reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real (RT-qPCR). El volumen total de reacción es de 20 μ l, utilizando unos 50 ng de ARN. La concentración final de los reactivos es 0,6 μ M de cebadores y 1% de intercalante (*Evagreen*®); el resto de reactivos, la retrotranscriptasa inversa (*RT OptiScript™ System*) y la polimerasa (*i-Star Taq polimerasa de ADN™*), van incluidos en los 10 μ l de mezcla utilizados según las recomendaciones del fabricante (Protocolo 4). Se emplea un termociclador RotorGene 6000 (*Corbett*). Las condiciones de ciclado consisten en una fase de incubación para la

retrotranscripción de 30 min. a 45°C, una fase de desnaturalización y activación de la polimerasa de 5 min. a 95°C, seguido por 45 ciclos de 15 seg. a 95°C, 20 seg. a la temperatura específica de hibridación de los cebadores (55°C) y 20 seg. a 72°C. La adquisición de la fluorescencia se hace durante la fase de síntesis (72°C). A continuación se lleva a cabo un análisis de las curvas de fusión que consiste en un incremento de la temperatura en etapas de 0,5°C con una duración de 5 segundos desde 65°C a 95°C, durante el cual se adquiere una segunda ronda de fluorescencia para detectar la temperatura en que las secuencias amplificadas se disocian en cadenas simples.

Se pone una muestra de ADNc de semen de un caballo como control positivo de amplificación y una de agua como control negativo.

Protocolo 4.- RT-qPCR.

Material

- Tubos eppendorf
- *One-Step RT-PCR PreMix Kit* de *INTRON BIOTECHNOLOGY*
- Cebadores 10 uM
- *Evagreen*[®], *BIOTIUM*
- Agua libre de RNasas
- Termociclador RotorGene 6000 (*Corbett*)

Método

- Se prepara una mezcla maestra con 10 µl de reactivo 2x, 1,2 µl de cebadores a 10 uM, 0,2 µl de *Evagreen*[®] y 4,6 µl de agua libre de RNasas.
- Se dispensan 4 µl de ARN digerido (50 ng) en los tubos de reacción.
- Se dispensan 16 µl de la mezcla maestra por reacción en cada tubo de reacción.

4. Análisis de datos

❖ 4.1. Determinación de genes de referencia

Se calcula el ciclo de cuantificación (Cq) de cada dilución, el ajuste de regresión entre el Cq y la dilución del ADN y la eficiencia global de la qPCR mediante el software propio del termociclador. La especificidad de la amplificación se confirma por los análisis de la curva de fusión y electroforesis en gel de agarosa.

La eficiencia de cada una de las muestras se calcula por separado mediante la opción de *Comparative Quantitation* del software propio del termociclador. La eficiencia corregida en los valores Cq se convierten a una escala lineal utilizando el método de ΔCq , donde el Cq se define como el punto en el la segunda derivativa del gráfico de

amplificación es un 20% del nivel máximo e indica el final del ruido y la transición a la fase exponencial.

Se van descartando del estudio aquellos genes con una mala amplificación, baja eficiencia de reacción o formación de dímeros.

Para la determinación de los mejores genes candidatos a genes de referencia se utilizan las herramientas informáticas *NORMFINDER*, *BESTKEEPER* y *GENORM*.

❖ 4.2. *Genes de expresión genética diferencial*

Una vez que tenemos unos genes de referencia adecuados para el tipo de muestra, podemos analizar la existencia de relaciones de sobreexpresión o infraexpresión de los diferentes genes problema estudiados con los parámetros de calidad seminal. Este análisis se realiza con el software *REST 2009*. Los parámetros a tener en cuenta son el porcentaje de espermatozoides estáticos (EST), motilidad progresiva (PMOT), VCL, VSL, VAP, LIN, STR, WOB, ALH, BCF y los valores de fragmentación a las 0, 4 y 6 horas de incubación postdescongelación. En función de cada uno de estos parámetros, las muestras se dividen en un grupo control, que es el grupo 1, y un grupo afectado, que es el grupo 2. Se analizan los datos de cada parámetro mediante una prueba de bondad de ajuste a la normalidad, con el test *Shapiro-Wilk*. En el caso de ser normal, los grupos se forman por aquellos datos superiores al percentil 60, para el grupo 1, e inferiores al percentil 40, para el grupo 2, dejando fuera de la comparación los datos intermedios. En aquellos casos que no se encuentran diferencias con los percentiles, se restringen los datos de los grupos a los cuartiles para aumentar la divergencia entre los grupos, formando el grupo 1 los datos superiores al tercer cuartil y el grupo 2 los inferiores al primer cuartil. En el caso de no ser normal, se establecen otros criterios específicos para cada caso.

Resultados

1. Cantidad y calidad de las muestras de ARN

El rendimiento del ARN total extraído calculado por espectrofotometría varía desde 10 hasta 26 ng/ μ l. En todos los casos hay amplificación del ARN y se comprueba que realizando una digestión adicional con DNasa tras la extracción, se consigue la eliminación total de ADN residual de la muestra.

En todos los casos se observa una amplificación con ciclos umbrales muy grandes, esto se debe a que hay muy poco ADNc en las muestras, aunque es suficiente para amplificar los diferentes genes candidatos.

2. RT-qPCR

Todos los genes son detectados en espermatozoides de caballo utilizando análisis de RT-qPCR.

Los productos de PCR para cada par de cebadores son del tamaño esperado cuando se visualiza mediante electroforesis en gel de agarosa, y la secuenciación de ADN confirma que los productos son específicos para los genes diana de interés.

❖ 2.1. Expresión genética

Se evalúan los niveles de expresión de todos los genes estudiados como candidatos a ser genes de referencia.

Tabla 4.- Valores medios de ciclos de cuantificación (*Cq*) calculados por muestra.

Gen	<i>Cq</i> medio	Desviación estándar
<i>ACTB</i>	28	0,8
<i>ATP5B</i>	30,7	1
<i>GAPDH</i>	27,7	1
<i>H2AI</i>	31,6	1,2
<i>HSP90</i>	26,9	8,9
<i>PRM1</i>	20	1,8
<i>RPL32</i>	29,9	1,1
<i>SDHA</i>	30,9	4,3
<i>UBQ</i>	29,6	1,9

Para ello se toma el promedio de la expresión medida en todas las muestras utilizadas ($n = 21$). De los nueve genes estudiados, *PRM1* se expresa en el nivel más alto, siendo el gen *H2AI* el que expresa el nivel mínimo (Tabla 4).

❖ 2.2. Eficiencia de reacción PCR

Los resultados del cálculo de la eficiencia de amplificación de todas las reacciones de RT-qPCR se muestran en la Tabla 5. Una reacción eficaz al 100% duplica en cada ciclo el número de fragmentos presentes en la reacción. La eficiencia se puede referir a 2 como valor absoluto de eficiencia, a 1 como un factor proporcional o a 100 en caso de porcentaje.

Los valores de eficiencia de la reacción son adecuados para todos los genes, a excepción de *HSP90* que es muy bajo, este gen debe descartarse para estudios posteriores.

Tabla 5.- Valores de eficiencia media de la reacción para cada gen.

Gen	Eficiencia	Eficiencia PCR (%)
<i>ACTB</i>	1,71 +- 0,05	85,5
<i>ATP5B</i>	1,73 +- 0,06	86,5
<i>GAPDH</i>	1,55 +- 0,30	77,5
<i>H2AI</i>	1,74 +- 0,12	87
<i>HSP90</i>	0,96 +- 0,84	48
<i>PRM1</i>	1,67 +- 0,02	83,5
<i>RPL32</i>	1,68 +- 0,03	84
<i>SDHA</i>	1,59 +- 0,52	79,5
<i>UBQ</i>	1,61 +- 0,04	80,5

❖ 2.3. Curvas de amplificación y fusión

En el estudio de las curvas de amplificación y fusión existen diferencias entre los genes.

Los genes *ACTB*, *ATP5B*, *PRM1*, *RPL32* y *UBQ* tienen una buena amplificación y el estudio de su curva de fusión muestra un pico limpio y único. Esto descarta la creación de productos inespecíficos o dímeros durante la reacción (Figura 4, 5, 6, 7 y 8).

Figura 4.- Curva de amplificación y curva de fusión de *ACTB*.

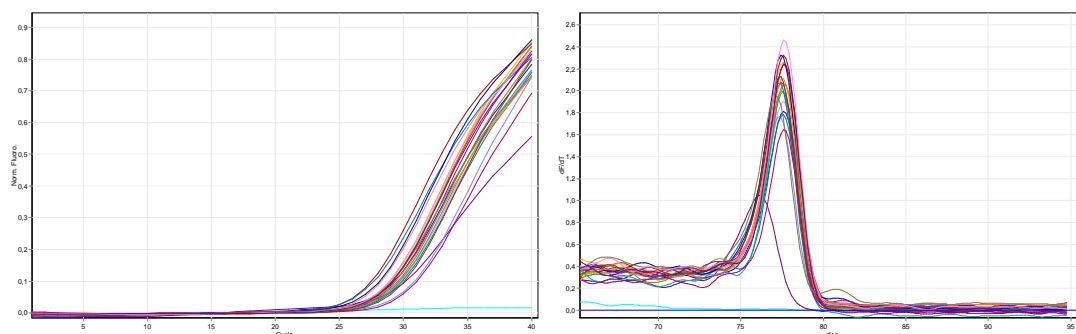


Figura 5.- Curva de amplificación y curva de fusión de ATP5B.

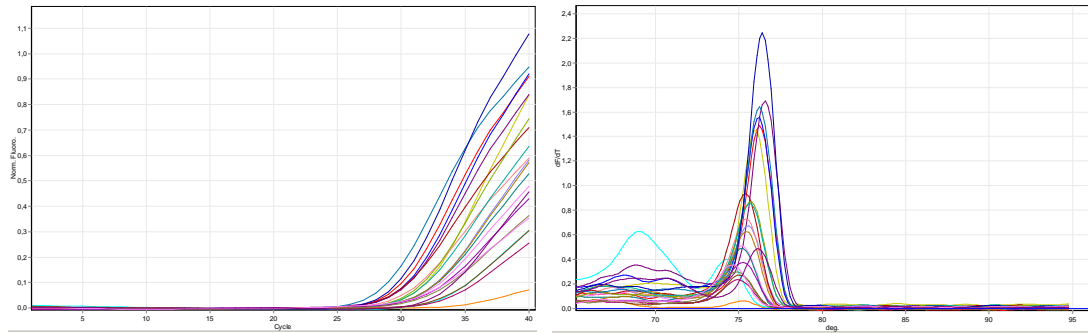


Figura 6.- Curva de amplificación y curva de fusión de PRM1.

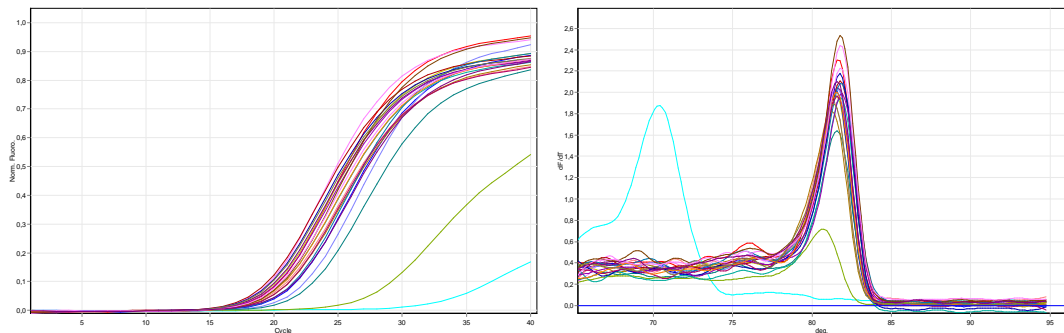


Figura 7.- Curva de amplificación y curva de fusión de RPL32.

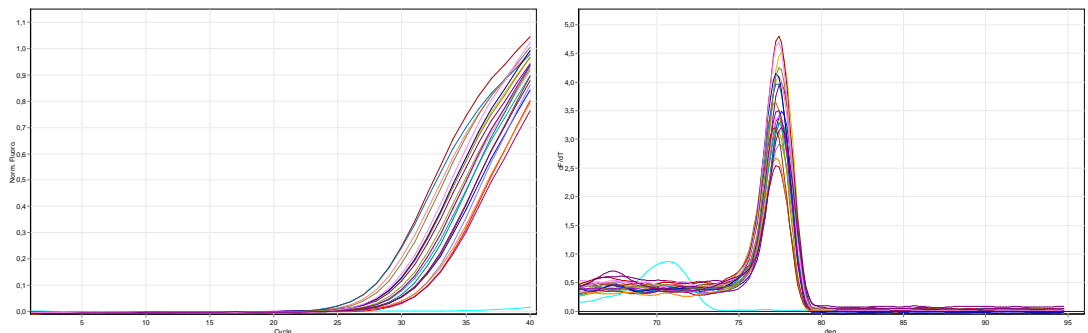
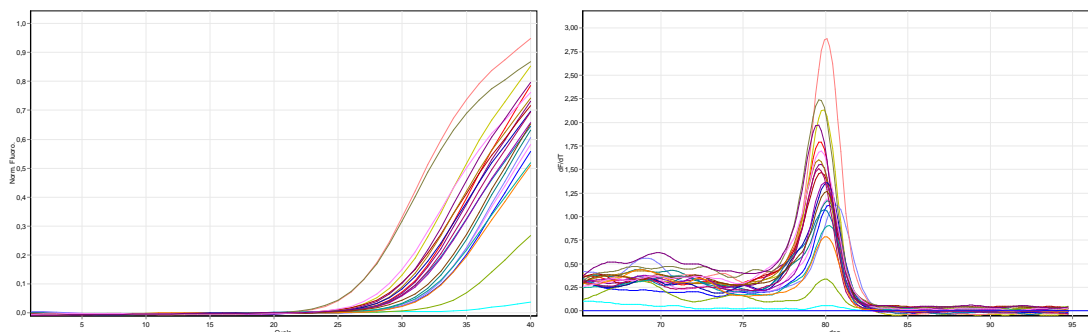


Figura 8.- Curva de amplificación y curva de fusión de UBQ.



El gen *GAPDH* y *H2AI*, a pesar de tener una curva de amplificación aparentemente buena, su curva de fusión no tiene un pico limpio observándose la creación de dímeros que tienen una temperatura de fusión baja (Figura 9 y 10).

Figura 9.- Curva de amplificación y curva de fusión de *GAPDH*.

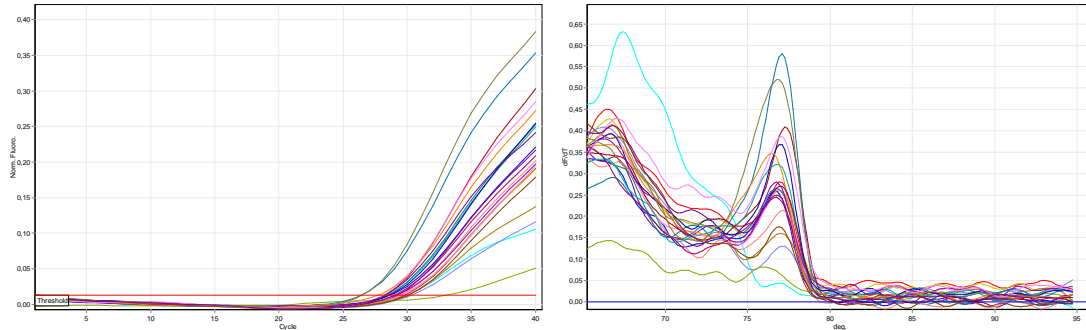
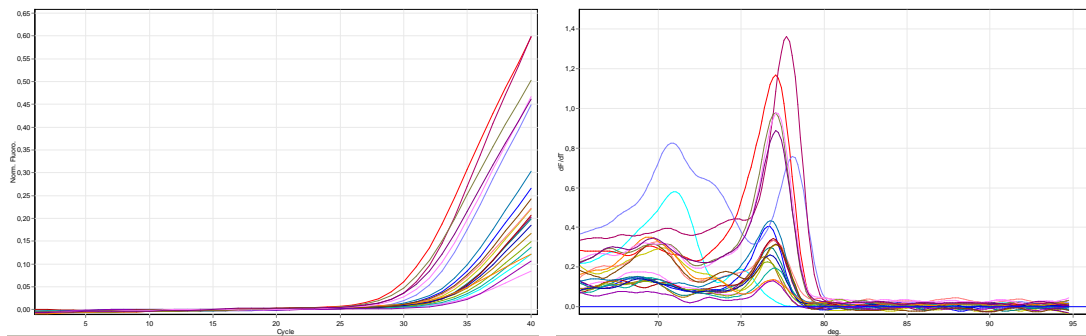


Figura 10.- Curva de amplificación y curva de fusión de *H2AI*.



Los genes *HSP90* y *SDHA* tienen las menores eficiencias de reacción. Algunas muestras no amplificaron y las que amplificaron tienen unos valores Cq más tardíos que en el resto de genes. El análisis de la curva de fusión pone de manifiesto la producción de numerosos productos inespecíficos de diferentes tamaños (Figura 11 y 12).

Figura 11.- Curva de amplificación y curva de fusión de *HSP90*.

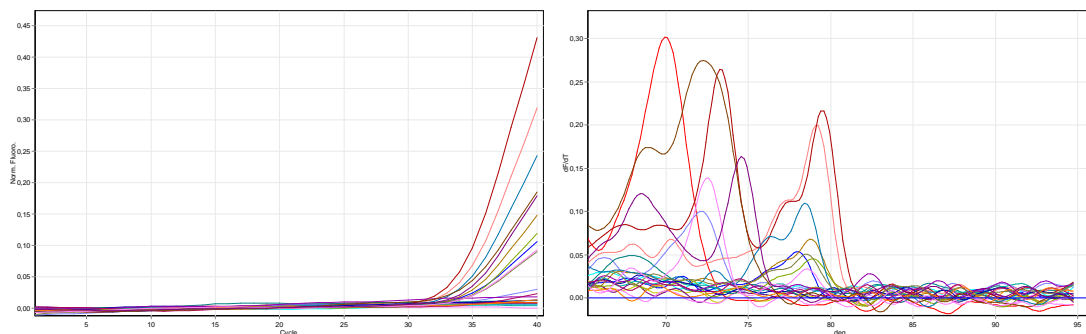
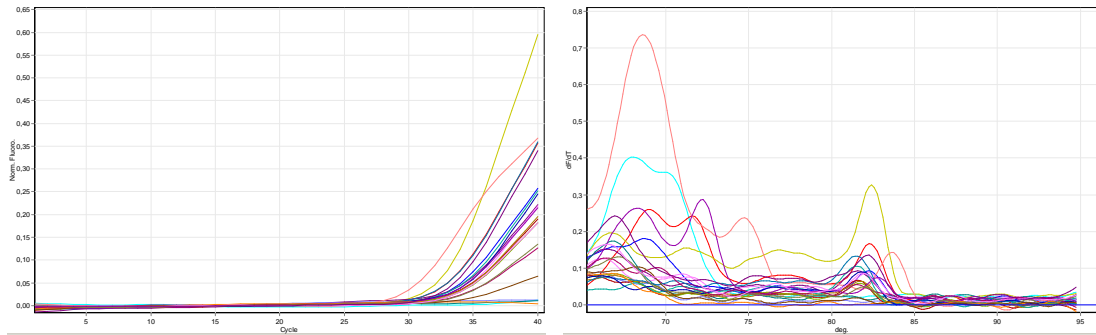


Figura 12.- Curva de amplificación y curva de fusión de SDHA.



Con estos resultados, descartamos los genes candidatos *HSP90*, *SDHA*, *H2A1* y *GAPDH* como genes de referencia, debido a una baja eficiencia de reacción o a la creación de productos inespecíficos en la reacción de PCR

3. Estabilidad de los genes de referencia y normalización de la expresión genética.

Se determinan los genes candidatos más adecuados para ser genes de referencia mediante las tres herramientas informáticas indicadas anteriormente.

❖ 3.1. NORMFINDER

Se calcula el valor de estabilidad para cada gen de referencia candidato y también toma en cuenta la variación en subgrupos, evitando la selección artificial de genes co-regulados. Los genes con la menor variación entre grupos en combinación con el promedio más bajo de variación dentro del grupo, serían los más estables, y por tanto, los más adecuados para ser utilizados como genes de referencia.

Para demostrar la estabilidad de los genes de referencia es necesario comparar grupos celulares en estado fisiológico o características diferentes, en este caso utilizamos los valores de motilidad progresiva, ya que se considera una característica estrechamente relacionada con la fertilidad. Se crean dos grupos tomando la media de los datos ($\bar{x} = 23,17$) como punto de división (Tabla 6). Las muestras con un porcentaje $>23\%$ de motilidad progresiva constituyen el grupo control (grupo 1) y las muestras que poseen $<23\%$ de motilidad progresiva constituyen el grupo afectado (grupo 2).

Tabla 6.- Grupos por motilidad progresiva.

Individuo	PMOT (%)	Grupo	Individuo	PMOT (%)	Grupo
6	36,9	1	2	22,9	2
10	36,5	1	16	22,3	2
14	32,6	1	3	21,9	2
8	32	1	13	20,1	2
16	30,9	1	20	18,7	2
4	30,4	1	19	17,9	2
15	29,1	1	9	16,3	2
17	29,1	1	7	15	2
20	24,2	1	11	14,8	2
			1	14,5	2
			5	11,6	2
			12	8,9	2

Se eliminan del estudio de estabilidad aquellos genes que ofrecieron mayores problemas durante la amplificación, como son *GAPDH*, *H2AI*, *HSP90* y *SDHA*, dejando sólo aquellos genes que ofrecen mayores garantías durante la reacción, ya que serán los más adecuados para ser utilizados como genes de referencia. El gen con mejor estabilidad es aquel cuyo valor de variación sea más próximo a 0.

Tabla 7.- Valores de estabilidad intra y entre grupos para cada uno de los genes candidatos.

Gen/Grupo	Dentro de grupos			Entre grupos			Estabilidad
	1	2	Variación	1	2	Variación	
<i>ACTB</i>	0,099	0,066	0,033	0,006	-0,006	0,012	0,090
<i>ATP5B</i>	0,316	0,262	0,054	0,038	-0,038	0,076	0,170
<i>PRM1</i>	0,913	0,401	0,512	-0,076	0,076	0,152	0,250
<i>RPL32</i>	0,105	0,069	0,036	-0,005	0,005	0,009	0,093
<i>UBQ</i>	0,420	0,245	0,174	0,037	-0,037	0,074	0,180

Es considerado mejor gen la *ACTB* con un valor de estabilidad de 0,090 y la mejor combinación de dos genes la formada por *ACTB* y *RPL32* con un valor de estabilidad de 0,065. La menor variación dentro de grupos ha sido la *ACTB* con un valor de 0,033 y entre grupos ha sido la *RPL32* con un valor de 0,009 (Tabla 7).

❖ 3.2. *BESTKEEPER*

Se realiza un análisis estadístico descriptivo de los genes candidatos utilizando los valores CP.

Tabla 8.- Estadística descriptiva calculada por BESTKEEPER.

	Genes candidatos					BESTKEEPER (ACTB, ATP5b y RPL32)
	ACTB	ATP5b	RPL32	PRM1	UBQ	
N	21	21	21	21	21	21
GM [CP]	28,45	30,94	30,40	20,51	30,08	29,91
AM [CP]	28,47	30,96	30,43	20,57	30,13	29,93
Min [CP]	26,80	28,90	28,20	18,90	26,30	27,95
Max [CP]	30,10	33,40	32,10	26,40	32,60	31,38
SD [\pm CP]	0,67	0,79	0,97	1,07	1,34	0,74
CV [% CP]	2,34	2,54	3,17	5,21	4,44	2,46

N: número de muestras; GM [CP]: media geométrica de CP; AM [CP]: media aritmética de CP; Min [CP] y Max [CP]: valores extremos de CP; SD [\pm CP]: desviación estándar de CP; CV [%CP]: coeficiente de variación expresado como porcentaje del nivel CP.

Se hace una primera estimación de la estabilidad con los valores CV y SD, siendo el más estable la *ACTB*, por tener el menor CV, seguido de *ATP5b* y *RPL32*. Los genes *PRM1* y *UBQ* se consideran inadecuados como genes de referencia por tener una $SD > 1$.

Tabla 9.- Análisis de correlación entre los genes candidatos y estos con el índice BESTKEEPER.

Vs.	ACTB	ATP5b	RPL32
ATP5b	0,656	-	-
p-value	0,002	-	-
RPL32	0,841	0,791	-
p-value	0,001	0,001	-

BESTKEEPER vs.	ACTB	ATP5b	RPL32
Coefficiente de correlación (r)	0,903	0,887	0,962
p-value	0,001	0,001	0,001
Coefficiente de determinación (r^2)	0,815	0,787	0,962
p-value	0,001	0,001	0,001

A partir de los 3 genes considerados estables, se calcula el Índice *BestKeeper* que tiene un CV de 2,46 y SD de 0,74, considerándose estables al analizarlos en conjunto.

Las correlaciones entre las parejas de genes candidatos y de estos con el índice resultan significativos ($p < 0,05$), siendo adecuados como genes de referencia porque todos se comportan del mismo modo y aportan un gran valor dentro del índice (Tabla 9).

❖ 3.3. GENORM

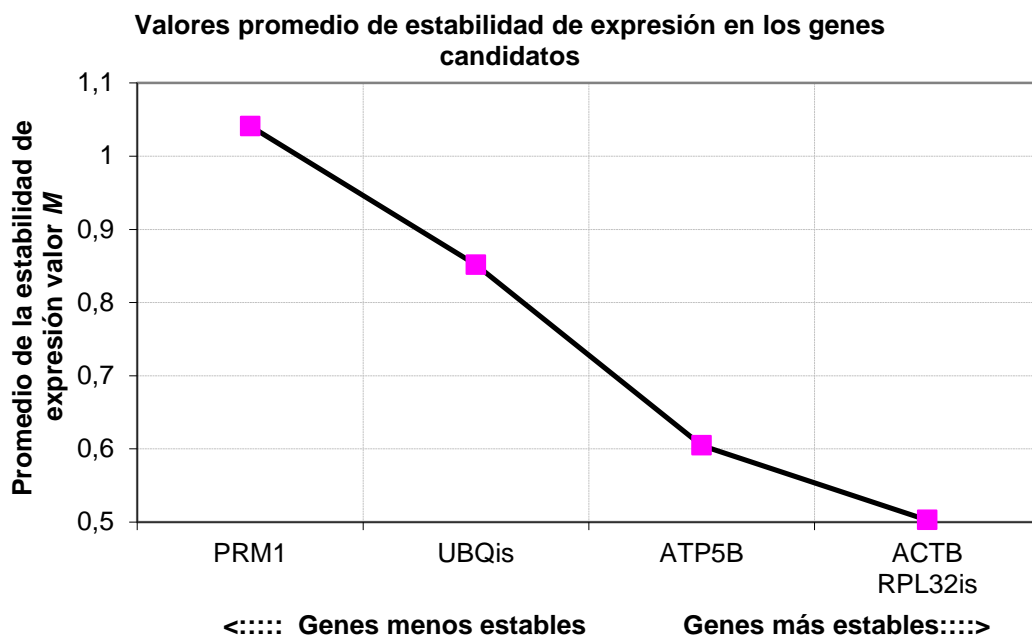
El valor de estabilidad M calculado por la aplicación *GENORM* tiene una relación inversa con la estabilidad, los resultados se muestran en la tabla 10.

Tabla 10.- Valor M de estabilidad calculado por *GENORM*.

Genes candidatos	<i>GENORM</i> M value
<i>ACTB</i>	0.880
<i>ATP5B</i>	1.019
<i>PRM1</i>	1.325
<i>RPL32</i>	0.868
<i>UBQ</i>	1.112

El gen más estable es *RPL32*, seguido de *ACTB*, *ATP5b*, *UBQ* y por último la *PRM1* (Figura 13). Ninguno de los genes sobrepasa el umbral de 1,5 establecido por defecto por el programa como umbral de inestabilidad; siguiendo este criterio, todos los genes podrían ser lo suficientemente estables.

Figura 13.- Representación gráfica de estabilidad con *GENORM*.



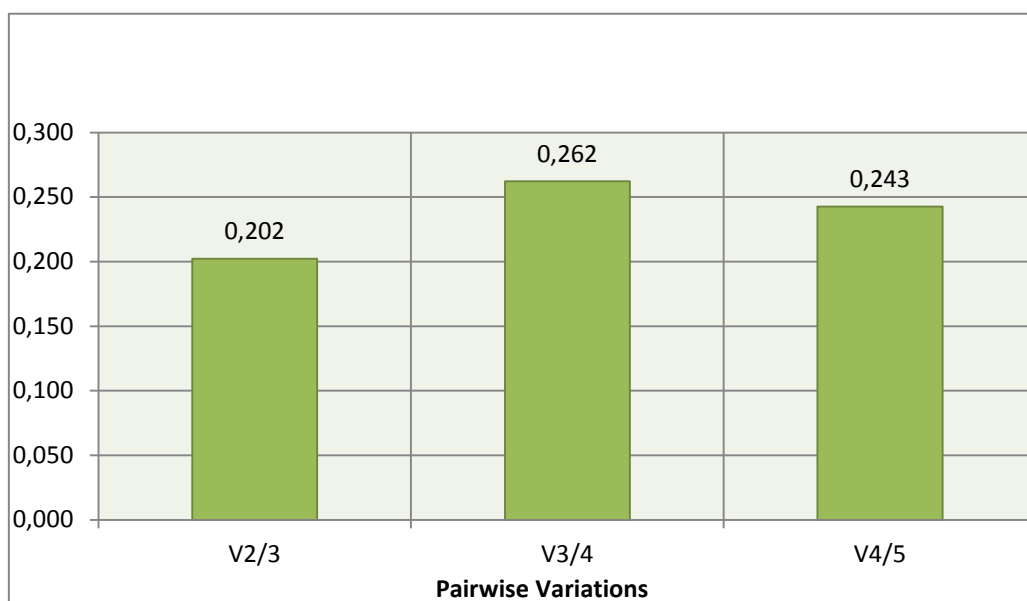
Un segundo paso es comprobar la estabilidad de los genes eliminando del estudio consecutivamente el menos estable hasta quedar con los dos más estables (Tabla 11), se observa que la estabilidad va mejorando a medida que eliminamos los genes con mayor M .

Tabla 11.- Valor *M* de la eliminación consecutiva del gen más inestable.

	Valor <i>M</i>			
<i>RPL32</i>	0,868	0,697	0,558	0,503
<i>ACTB</i>	0,880	0,748	0,600	0,503
<i>ATP5b</i>	1,019	0,863	0,656	-
<i>UBQ</i>	1,112	1,098	-	-
<i>PRM1</i>	1,325	-	-	-

El último paso es determinar el número óptimo de genes para normalizar. Se recomienda utilizar los tres genes más estables y que por tanto tienen el menor valor de *M*. Este último paso es una orientación que no se puede aplicar en todos los casos. Se suele utilizar el criterio de una varianza menor de 0,15 como indicador de que la adición de un gen más de referencia no es necesaria, pero en nuestro estudio es difícil imponer este criterio porque todas las varianzas por parejas son superiores a 0,15; el valor más bajo lo da *V* 2/3 que nos podría indicar en este caso que el número óptimo de genes sería dos.

Figura 14.- Determinación del número óptimo de genes de referencia.



Cuando comparamos los resultados obtenidos de las tres herramientas informáticas (Tabla 12), comprobamos que todas ellas coinciden en los tres mejores genes: *ACTB*, *ATP5b* y *RPL32*. Estos tres genes son los confirmados como mejores genes de referencia para semen equino criopreservado.

Tabla 12.- Clasificación de los genes de referencia analizados por las diferentes metodologías.

Genes candidatos				
Clasificación	Eficiencia qPCR	<i>NORMFINDER</i>	<i>BESTKEEPER</i>	<i>GeNorm</i>
1	<i>ATP5b</i>	<i>ACTB</i>	<i>ACTB</i>	<i>RPL32</i>
2	<i>ACTB</i>	<i>RPL32</i>	<i>ATP5b</i>	<i>ACTB</i>
3	<i>RPL32</i>	<i>ATP5b</i>	<i>RPL32</i>	<i>ATP5b</i>
4	<i>PRM1</i>	<i>UBQ</i>	(<i>UBQ</i>)	<i>UBQ</i>
5	<i>UBQ</i>	<i>PRM1</i>	(<i>PRM1</i>)	<i>PRM1</i>

4. Expresión diferencial

Se estudian todos los genes descartados como genes de referencia, por si su expresión más inestable se encuentra relacionada con algún parámetro de calidad seminal. Para ello utilizamos el programa *REST 2009*, que nos permite analizar la expresión relativa y comparar dos grupos, donde se utilizan los tres genes de referencia ya seleccionados (*ACTB*, *RPL32* y *ATP5b*). En el caso del espermatozoide lo que se observa es un resto de actividad transcripcional que se correlacionaría con una expresión en las espermatogonias.

El modelo matemático que utiliza el software se basa en las eficiencias de PCR y la desviación media del punto de cruce entre la muestra y el grupo control. Posteriormente, los resultados de los ratios de expresión de los transcritos investigados se someten a pruebas de significación con una prueba de aleatorización para minimizar los errores y aumentar la potencia del contraste (Pfaffl et al. 2002).

Todos los genes descartados como genes de referencia pueden ser analizados por el programa, a excepción de *HSP90* que es eliminado del análisis por su baja eficiencia. Se van a analizar las posibles relaciones de los genes *UBQ*, *PRM1*, *GAPDH*, *SDHA* y *H2A1* con los parámetros de calidad seminal de *EST*, *PMOT*, *VCL*, *VSL*, *VAP*, *LIN*, *STR*, *WOB*, *ALH*, *BCF* y fragmentación a las 0, 4 y 6 horas. En función de estos parámetros, se crean dos grupos. El test Shapiro-Wilk demuestra que todos los parámetros tienen una distribución normal, a excepción de los tres valores de fragmentación. Se crean los grupos con los valores de percentiles y cuartiles (tabla 13). Los datos superiores al percentil 60 constituyen el grupo 1 y por debajo del percentil 40 el grupo 2. Cuando no se encuentran diferencias en estos grupos se utilizan los cuartiles 1 y 3 para aumentar la divergencia entre los grupos, siendo los valores superiores al cuartil 3 el grupo 1 y los inferiores al cuartil 1 el grupo 2. Para los parámetros de fragmentación, que no se ajustan a una distribución

normal, se establece un valor umbral, que es 15% en 0 horas, 25% en 4 horas y 30% en 6 horas.

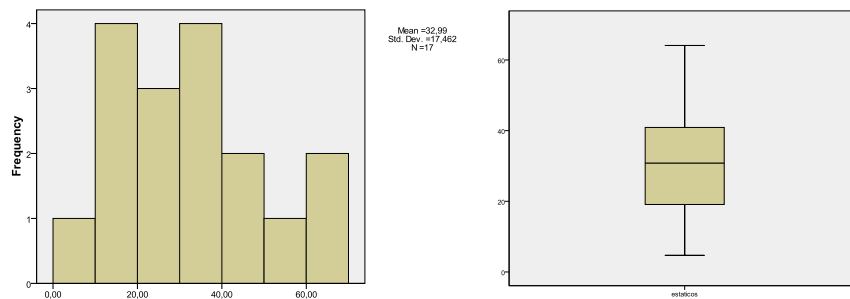
Tabla 13.-Valores estadísticos para los diferentes parámetros de calidad seminal.

Valores estadísticos	Estáticos	PMOT	VCL	VSL	VAP	LIN	STR	WOB	ALH	BCF
Media	34,48	23,17	70,3	33,4	46,5	47,5	71,3	66,5	3,1	8,3
Mediana	32,2	22,28	70,5	30,7	45,8	46,4	72,4	68,7	3,1	8,5
Percentil 60 (grupo 1)	38,58	24,2	72,49	33,97	48,83	49,62	73,37	69,28	3,28	8,53
Percentil 40 (grupo 2)	28	20,11	68,03	29,03	42,71	45,27	69,79	64,81	2,94	8,27
Cuartil 3 (grupo 1)	48,3	30,4	82,67	37,22	49,71	51,73	74,80	70,36	3,43	8,99
Cuartil 1 (grupo 2)	19,1	16,3	62,85	26,71	71,07	42,56	65,94	62,88	2,81	7,91

❖ 4.1. Espermatozoides estáticos (EST)

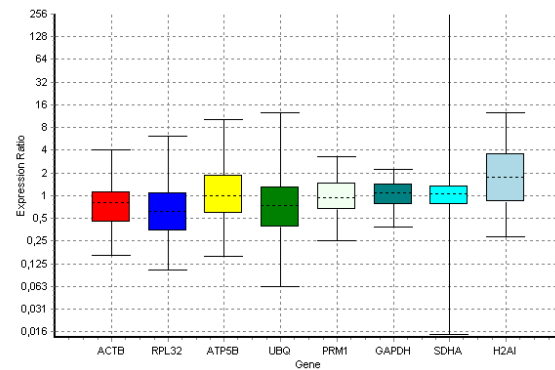
Los datos se ajustan a una distribución normal (Figura 15).

Figura 15.- Histograma y gráfico de cajas y bigotes para porcentaje de EST.



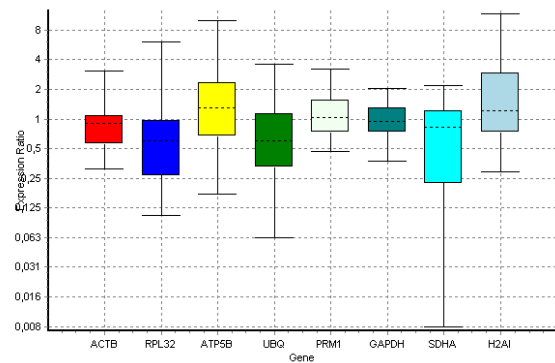
Utilizando el percentil 40 y 60 se crean dos grupos de 9 animales cada uno. No existen diferencias significativas entre los grupos para ninguno de los genes (Figura 16).

Figura 16.- Diagrama de cajas y bigotes del nivel de expresión del percentil 40 y 60 para EST.



Utilizando los cuartiles 1 y 3 se crean dos grupos de 6 animales cada uno. No existen diferencias significativas entre los grupos para ninguno de los genes (Figura 17).

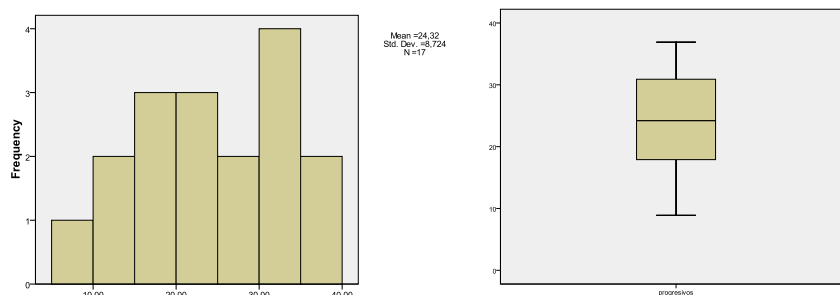
Figura 17.- Diagrama de cajas y bigotes del nivel de expresión del cuartil 1 y 3 para EST.



❖ 4.2. Motilidad progresiva (PMOT)

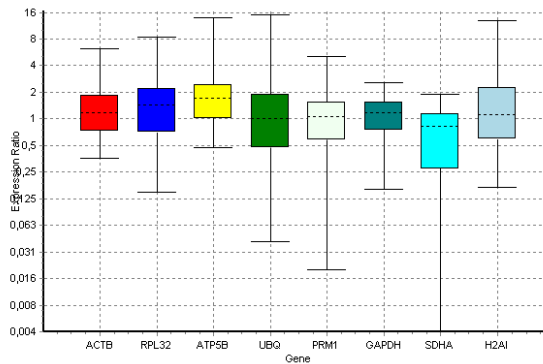
Los datos se ajustan a una distribución normal (Figura 18).

Figura 18.- Histograma y gráfico de cajas y bigotes para PMOT.



Utilizando el percentil 40 y 60 se crean dos grupos de 9 animales cada uno. Existen diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los grupos para el gen *SDHA*, que se encuentra infraexpresado en grupo 2 (aquellos con menos motilidad progresiva) respecto al grupo 1 (Figura 19).

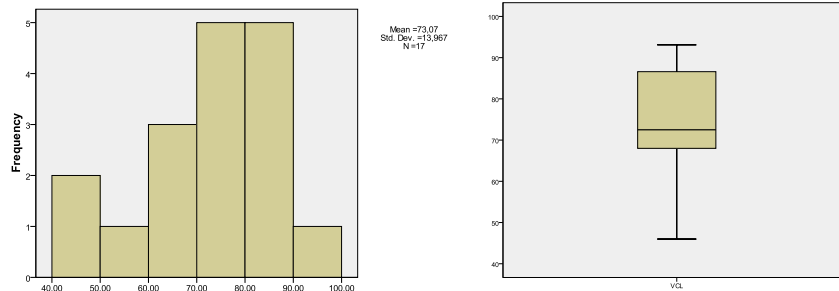
Figura 19.- Diagrama de cajas y bigotes del nivel de expresión del percentil 40 y 60 para PMOT.



❖ 4.3. Velocidad curvilínea (VCL)

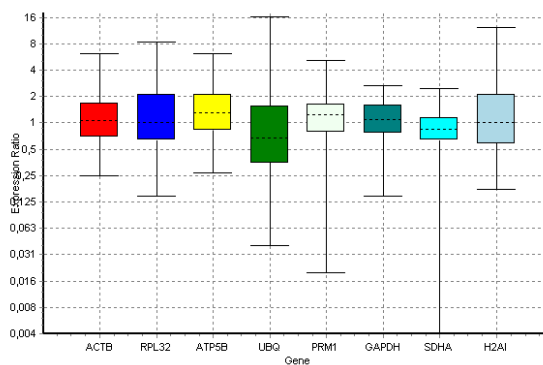
Los datos se ajustan a una distribución normal (Figura 20).

Figura 20.- Histograma y gráfico de cajas y bigotes para VCL.



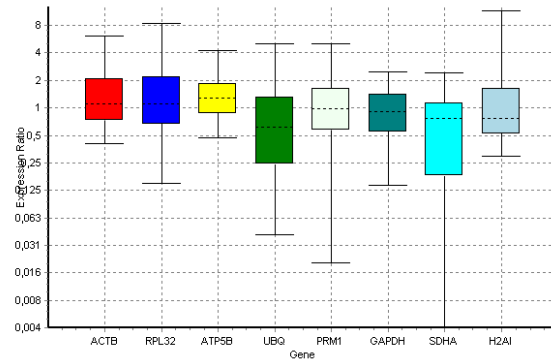
Utilizando el percentil 40 y 60 se crean dos grupos de 9 animales cada uno. No existen diferencias significativas entre los grupos para ninguno de los genes (Figura 21).

Figura 21.- Diagrama de cajas y bigotes del nivel de expresión del percentil 40 y 60 para VCL.



Utilizando los cuartiles 1 y 3 se crean dos grupos de 6 animales cada uno. No existen diferencias significativas entre los grupos para ninguno de los genes (Figura 22).

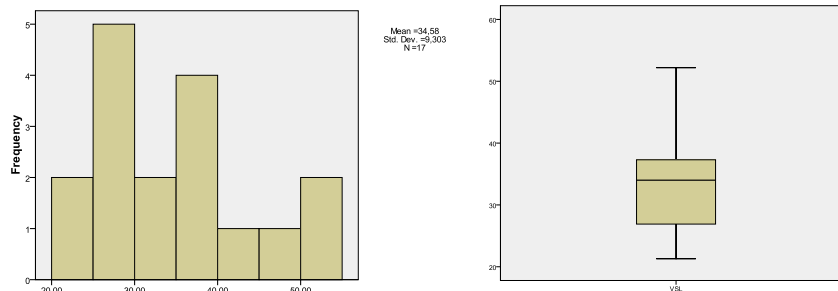
Figura 22.- Diagrama de cajas y bigotes del nivel de expresión del cuartil 1 y 3 para VCL.



❖ 4.4. Velocidad rectilínea (VSL)

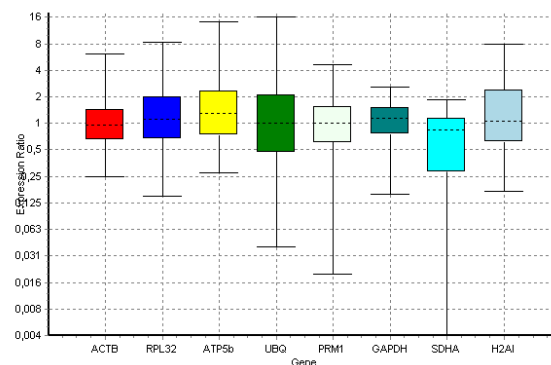
Los datos se ajustan a una distribución normal (Figura 23).

Figura 23.- Histograma y gráfico de cajas y bigotes para VSL.



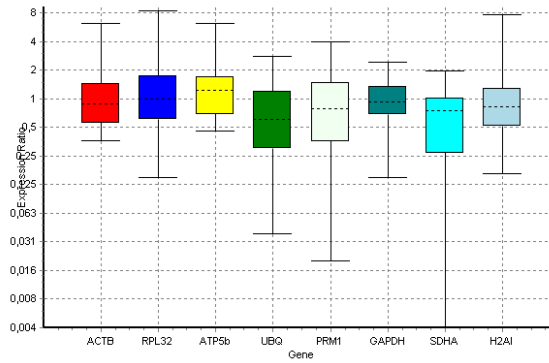
Utilizando el percentil 40 y 60 se crean dos grupos de 9 animales cada uno. No existen diferencias significativas entre los grupos para ninguno de los genes (Figura 24).

Figura 24.- Diagrama de cajas y bigotes del nivel de expresión del percentil 40 y 60 para VSL.



Utilizando los cuartiles 1 y 3 se crean dos grupos de 6 animales cada uno. No existen diferencias significativas entre los grupos para ninguno de los genes (Figura 25).

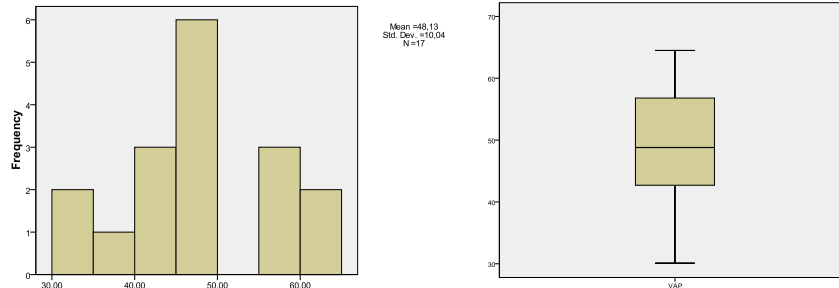
Figura 25.- Diagrama de cajas y bigotes del nivel de expresión del cuartil 1 y 3 para VSL.



❖ 4.5. Velocidad promedio (VAP)

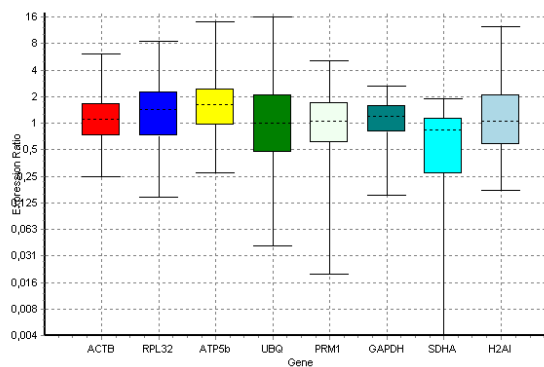
Los datos se ajustan a una distribución normal (Figura 26).

Figura 26.- Histograma y gráfico de cajas y bigotes para VAP.



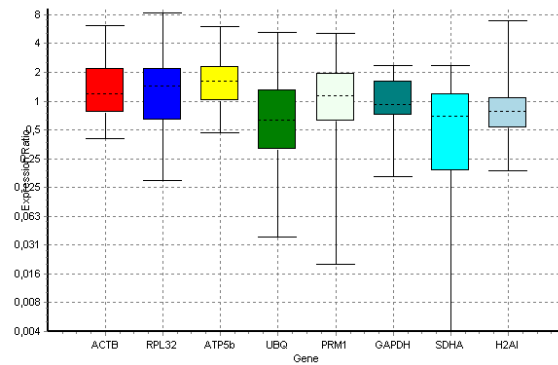
Utilizando el percentil 40 y 60 se crean dos grupos de 9 animales cada uno. No existen diferencias significativas entre los grupos para ninguno de los genes (Figura 27).

Figura 27.- Diagrama de cajas y bigotes del nivel de expresión del percentil 40 y 60 para VAP.



Utilizando los cuartiles 1 y 3 se crean dos grupos de 6 animales cada uno. No existen diferencias significativas entre los grupos para ninguno de los genes (Figura 28).

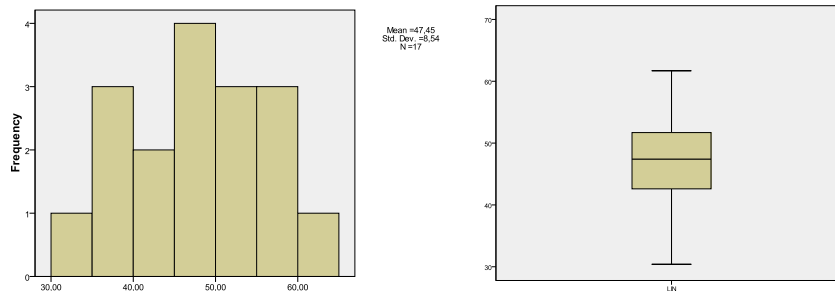
Figura 28.- Diagrama de cajas y bigotes del nivel de expresión del cuartil 1 y 3 para VAP.



❖ 4.6. Linealidad (LIN)

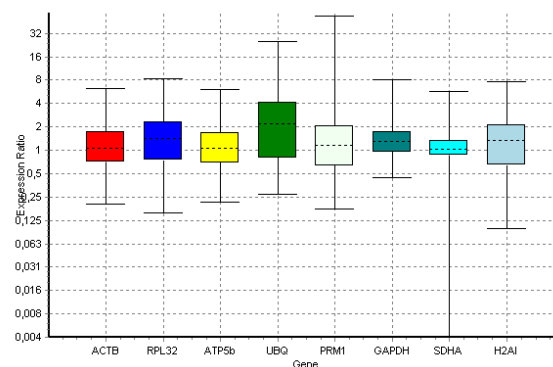
Los datos se ajustan a una distribución normal (Figura 29).

Figura 29.- Histograma y gráfico de cajas y bigotes para LIN.



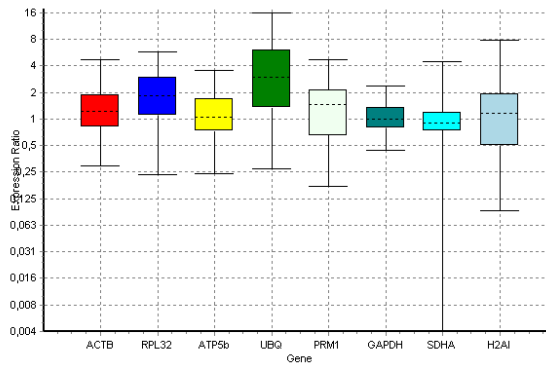
Utilizando el percentil 40 y 60 se crean dos grupos de 9 animales cada uno. No existen diferencias significativas entre los grupos para ninguno de los genes (Figura 30).

Figura 30.- Diagrama de cajas y bigotes del nivel de expresión del percentil 40 y 60 para LIN.



Utilizando los cuartiles 1 y 3 se crean dos grupos de 6 animales cada uno. Existen diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los grupos para el gen *UBQ*, que se encuentra sobreexpresado en grupo 2 (aquellos con menos LIN) respecto al grupo 1. Este parámetro es un ratio calculado por la división de VCL entre VSL (Figura 31).

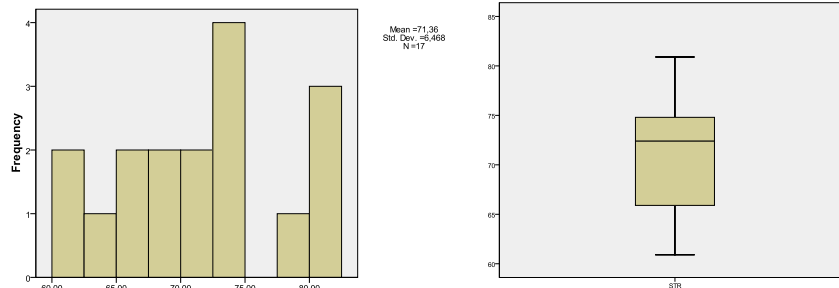
Figura 31.- Diagrama de cajas y bigotes del nivel de expresión del cuartil 1 y 3 para LIN.



❖ 4.7. Índice de rectitud (STR)

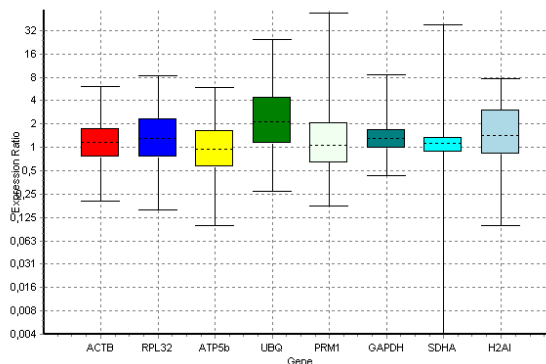
Los datos se ajustan a una distribución normal (Figura 32).

Figura 32.- Histograma y gráfico de cajas y bigotes para STR.



Utilizando el percentil 40 y 60 se crean dos grupos de 9 animales cada uno. Existen diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los grupos para el gen *UBQ*, que se encuentra sobreexpresado en grupo 2 (aquellos con menos STR) respecto al grupo 1. Este parámetro es un ratio calculado por la división de VSL entre VAP (Figura 33).

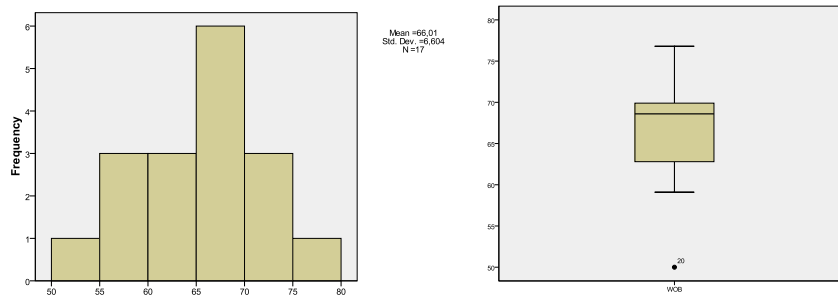
Figura 33.- Diagrama de cajas y bigotes del nivel de expresión del percentil 40 y 60 para STR.



❖ 4.8. Índice de oscilación (WOB)

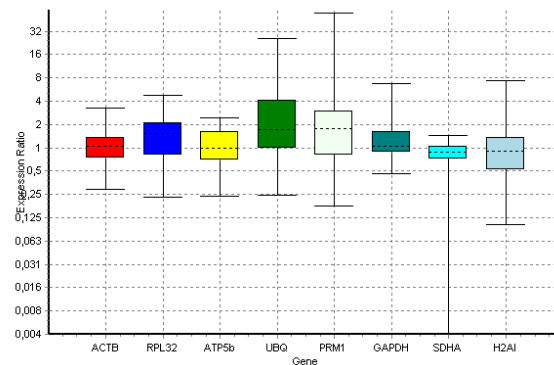
Los datos se ajustan a una distribución normal (Figura 34).

Figura 34.- Histograma y gráfico de cajas y bigotes para WOB.



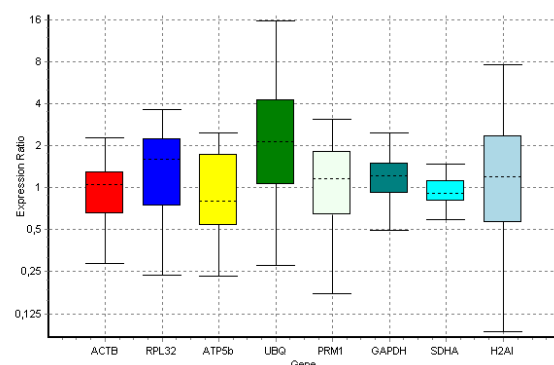
Utilizando el percentil 40 y 60 se crean dos grupos de 7 animales cada uno. No existen diferencias significativas entre los grupos para ninguno de los genes (Figura 35).

Figura 35.- Diagrama de cajas y bigotes del nivel de expresión del percentil 40 y 60 para WOB.



Utilizando los cuartiles 1 y 3 se crean dos grupos de 5 animales cada uno. No existen diferencias significativas entre los grupos para ninguno de los genes (Figura 36).

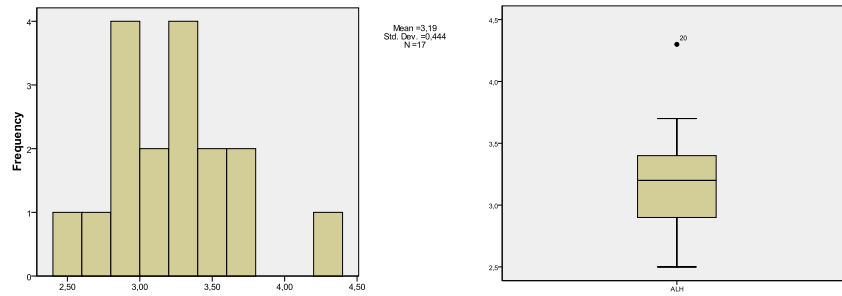
Figura 36.- Diagrama de cajas y bigotes del nivel de expresión del cuartil 1 y 3 para WOB.



❖ 4.9. Desplazamiento lateral de la cabeza (ALH)

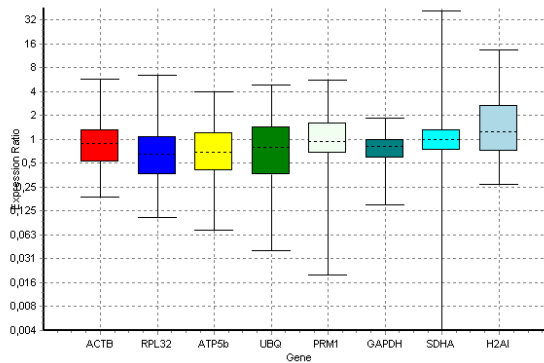
Los datos se ajustan a una distribución normal (Figura 37).

Figura 37.- Histograma y gráfico de cajas y bigotes para ALH.



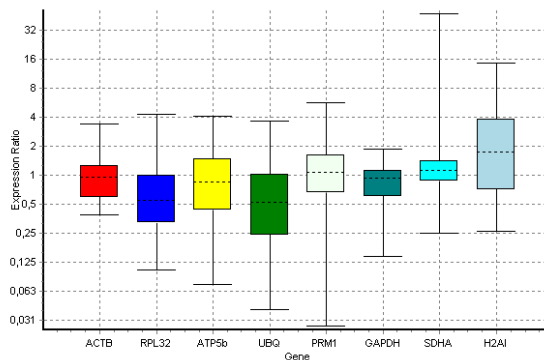
Utilizando el percentil 40 y 60 se crean dos grupos de 9 animales cada uno. No existen diferencias significativas entre los grupos para ninguno de los genes (Figura 38).

Figura 38.- Diagrama de cajas y bigotes del nivel de expresión del percentil 40 y 60 para ALH.



Utilizando los cuartiles 1 y 3 se crean dos grupos de 6 animales cada uno. No existen diferencias significativas entre los grupos para ninguno de los genes (Figura 39).

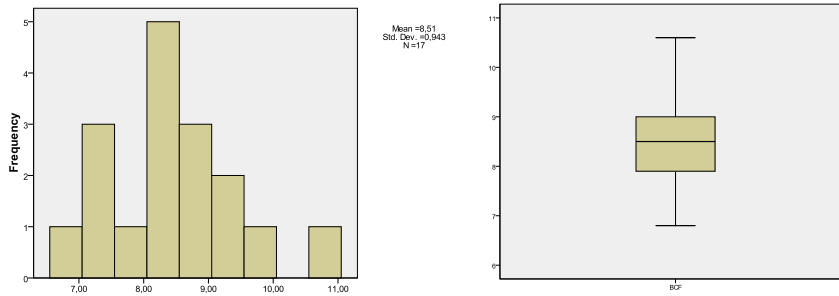
Figura 39.- Diagrama de cajas y bigotes del nivel de expresión del cuartil 1 y 3 para ALH.



❖ 4.10. Frecuencia de batida (BCF)

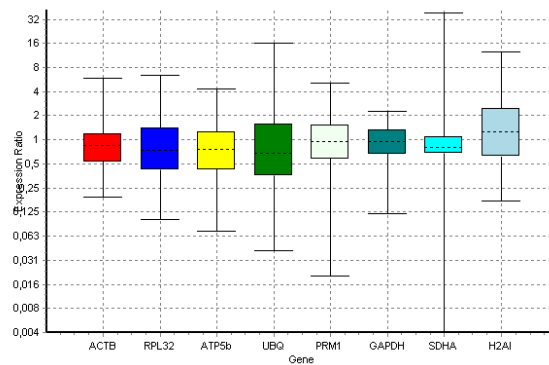
Los datos se ajustan a una distribución normal (Figura 40).

Figura 40.- Histograma y gráfico de cajas y bigotes para BCF.



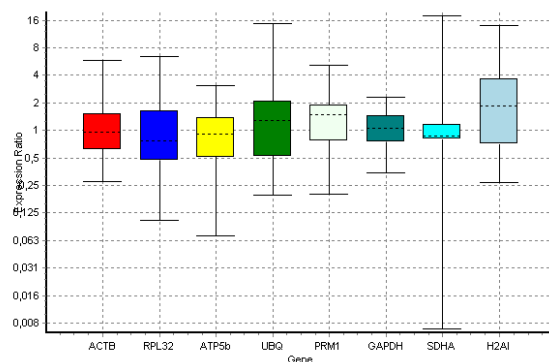
Utilizando el percentil 40 y 60 se crean dos grupos de 9 animales cada uno. No existen diferencias significativas entre los grupos para ninguno de los genes (Figura 41).

Figura 41.- Diagrama de cajas y bigotes del nivel de expresión del percentil 40 y 60 para BCF.



Utilizando los cuartiles 1 y 3 se crean dos grupos de 6 animales cada uno. No existen diferencias significativas entre los grupos para ninguno de los genes (Figura 42).

Figura 42.- Diagrama de cajas y bigotes del nivel de expresión del cuartil 1 y 3 para BCF.



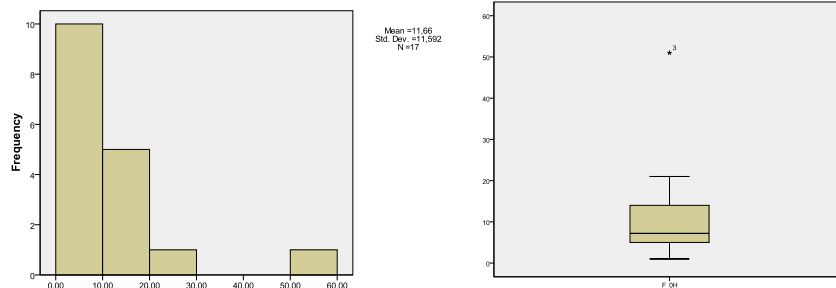
❖ 4.11. Fragmentación

Las muestras, respecto a su valor de fragmentación, no tienen una distribución normal ya que la población de partida ha ido sufriendo una selección artificial en este parámetro y disponemos de pocos animales con fragmentación alta.

0 horas

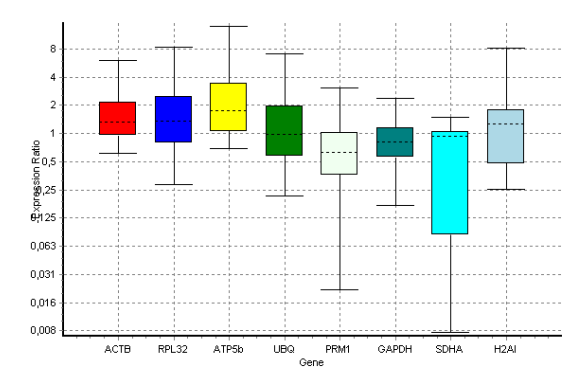
Los datos no se ajustan a una distribución normal ($p < 0,05$) (Figura 43).

Figura 43.- Histograma y gráfico de cajas y bigotes para fragmentación a 0 horas.



Se establece el punto de corte en el 15% del índice de fragmentación, ya que se considera que los valores normales de fragmentación están por debajo de este valor (Gosálvez et al. 2010). Se crean dos grupos de 6 animales cada uno, el grupo 1 con valores $< 15\%$ y el grupo 2 con valores $\geq 15\%$. Existen diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los grupos para los genes *PRM1* y *GAPDH*, que se encuentran infraexpresados en grupo 2 (aquellos con mayor fragmentación) respecto al grupo 1 (Figura 44).

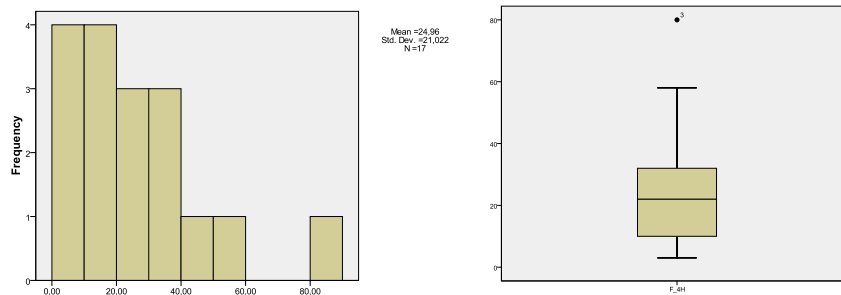
Figura 44.- Diagrama de cajas y bigotes del nivel de expresión para fragmentación a 0 horas.



4 horas

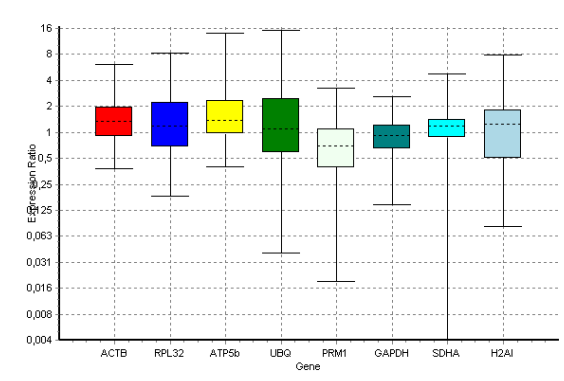
Los datos no se ajustan a una distribución normal ($p < 0,05$) (Figura 45).

Figura 45.- Histograma y gráfico de cajas y bigotes para fragmentación a 4 horas.



Se establece como punto de corte un índice de fragmentación del 25%, ya que la media y la mediana están próximos a este valor (24,7 y 23,5 respectivamente). Se crean dos grupos de 10 animales cada uno, el grupo 1 con valores $< 25\%$ y el grupo 2 con valores $\geq 25\%$. Existen diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los grupos para el gen *PRMI*, que se encuentran infraexpresado en grupo 2 (aquellos con mayor fragmentación) respecto al grupo 1 (Figura 46).

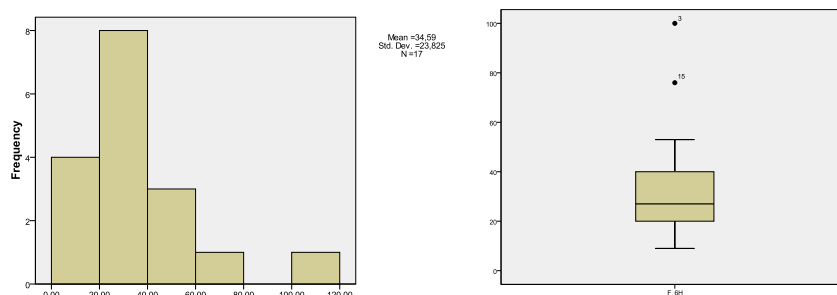
Figura 46.- Diagrama de cajas y bigotes del nivel de expresión para fragmentación a 4 horas.



6 horas

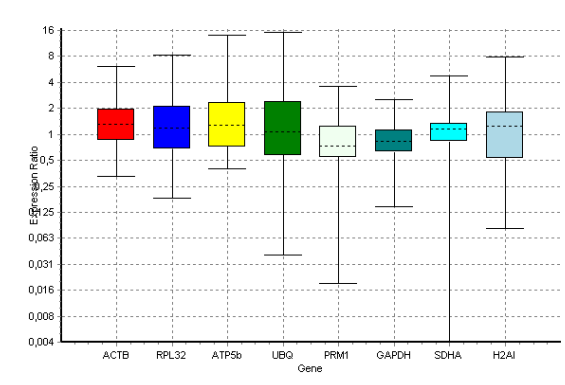
Los datos no se ajustan a una distribución normal ($p < 0,05$) (Figura 47).

Figura 47.- Histograma y gráfico de cajas y bigotes para fragmentación a 6 horas.



Se establece como punto de corte un índice de fragmentación del 30%, que aparte de ser un valor próximo a la media y la mediana (35,5 y 29,5 respectivamente), es considerado un valor a partir del cual se consideran animales potencialmente infértiles (Gosálvez et al. 2010). Se crean dos grupos de 10 animales cada uno, el grupo 1 con valores < 30% y el grupo 2 con valores \geq 30%. Existen diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los grupos para el gen *GAPDH*, que se encuentran infraexpresado en grupo 2 (aquellos con mayor fragmentación) respecto al grupo 1 (Figura 48).

Figura 48.- Diagrama de cajas y bigotes del nivel de expresión para fragmentación a 6 horas.



La siguiente tabla (Tabla 14) muestra un resumen de los hallazgos encontrados de expresión diferencial en los genes estudiados, para un valor $p < 0,05$, en el grupo de peor calidad seminal respecto al mejor grupo.

Tabla 14.- Resultados de expresión relativa de genes estudiados.

Gen	UBQ	PRM1	P(H1)* GAPDH	SDHA	H2AI
EST					
PMOT				infraexpresado**	
VCL					
VSL					
VAP					
LIN	sobreexpresado**				
STR	sobreexpresado**				
WOB					
ALH					
BCF					
F. 0 horas		infraexpresado**	infraexpresado**		
F. 4 horas		infraexpresado**			
F. 6 horas			infraexpresado**		

*P(H1) es probabilidad de la hipótesis alternativa que la diferencia entre grupo muestra y control es debido al azar.

** Valor significativo de expresión respecto a los genes de referencia.

Discusión

La conservación de los recursos zoogenéticos es la puesta en marcha de todas las acciones necesarias para garantizar la adecuada gestión de los mismos, para poder ser utilizados el máximo de tiempo posible y poder brindar beneficios sustentables para las futuras generaciones (Scherf 2000).

Las técnicas actualmente accesibles y económicamente viables para la conservación de recursos zoogenéticos incluyen la criopreservación de células reproductivas, embriones y tejidos. Los bancos de recursos zoogenéticos no pueden reemplazar a las poblaciones vivas, pero proporcionan nuevas oportunidades en los programas de manejo de aquellas que se encuentran reducidas o aisladas (Holt y Pickard 1999), además la utilización de semen congelado en la reproducción asistida tiene como ventajas: la disminución de los costes de transporte (más barato es trasladar un contenedor de nitrógeno líquido que un semental); menor estrés y coste en el transporte de la yegua; continuidad de la temporada reproductiva, en caso de que el reproductor presente alguna lesión o esté compitiendo; las diferentes temporadas reproductivas entre el hemisferio norte y sur no generan problema; la utilización de semen de reproductores de alto valor genético incluso cuando éste haya fallecido; reducción del uso de reproductores genéticamente inferiores, ya que éstos pueden ser seleccionados independientemente de la ubicación geográfica; y almacenamiento de semen proveniente de animales jóvenes que serán sometidos a castración (Squires y col 1999).

Por otro lado las muestras almacenadas en bancos de germoplasma ofrecen una oportunidad única para estudiar la expresión de genes que pudiesen estar relacionados con genes de adaptación al medio ambiente y de resistencia a enfermedades, así como para la investigación de genes implicados en diferentes aspectos relacionados con la calidad seminal y fertilidad del semental, y ser un dato más en la valoración y selección del semental más adecuado.

La extracción de ARN a partir de muestras de semen implica una serie de dificultades derivadas de la propia naturaleza del espermatozoide. Das (2010) expone que existen diferencias entre especies en atributos y empaquetamiento del semen, por lo que los protocolos de aislamiento de ARN de semen deberían ser ajustados a cada una de ellas. Estos autores comparan dos métodos de extracción en semen de équidos fresco, refrigerado y congelado sin crioprotectores, y finalmente recomiendan el método de extracción

orgánica (*TRIZOL*[®] de *INVITROGEN*). Los resultados obtenidos sobre las muestras congeladas no resultan satisfactorios. La diferencia con la metodología empleada en nuestro trabajo es que se usan muestras destinadas a la fecundación procedentes de un banco de germoplasma, es decir, que contienen crioprotectores para preservar los espermatozoides viables en nitrógeno líquido. En 2014 Ing utiliza la extracción orgánica con tratamiento DNasa en espermatozoides equinos frescos.

Varios autores optan por una extracción orgánica de semen congelado de toro sometiendo la mezcla de espermatozoides y solución orgánica (*TRIZOL*[®] de *INVITROGEN*) a 60°C durante 30 min. (Ostermeier et al. 2005; Lalancette et al. 2008). Sin embargo Bissonnette y col. (2009) realizan un estudio sobre perfiles de expresión de ARNm en espermatozoides de toro con diferente grado de motilidad mediante el uso de dos protocolos de extracción orgánica, uno en frío y otro en caliente. Encuentran que éstos no son significativamente diferentes con la extracción orgánica en frío, pero sí lo son cuando se emplea en caliente. También reconocen la poca cantidad de ARN obtenido por lo que deben recurrir a la amplificación del mismo antes de la retrotranscripción para estudios de muchos genes.

Li y col. (2011) usan con éxito el método de las columnas en semen congelado bovino. Steilmann y col. (2010) emplean el método de las columnas en semen fresco humano (*RNA extraction kit RNeasy MINI* de *QIAGEN*).

Existe otro estudio en semen bovino fresco en el que se ha realizado un método de extracción orgánica seguida de columnas que incluye un tratamiento DNasa (Ganguly et al. 2013), que al igual que es nuestro estudio, la extracción ha resultado satisfactoria. Pero a pesar de llevar incorporado en el protocolo de extracción un tratamiento DNasa en la columna, la muestra de ARN sigue teniendo una cantidad de ADN residual, por lo que es necesario realizar un tratamiento DNasa adicional tras la extracción. Esta situación puede ser debida al especial empaquetamiento de la cromatina en el espermatozoide equino que dificulta la eliminación de ADN residual.

El rendimiento de ARN obtenido durante la extracción en este trabajo coincide con los valores obtenidos por Avendano en 2009, que son 10-20 ng/μl a partir de espermatozoides humanos seleccionados por su mayor motilidad mediante *swim-up*. Goodwin en 2000 obtiene un rendimiento mayor en espermatozoides humanos y en su

estudio aporta que el rendimiento disminuye en semen congelado respecto a fresco. Esto se contradice con el trabajo de Wrench y col. (2010), donde comparan niveles de expresión genética de ARNm en semen equino fresco y criopreservado recolectado en diferentes estaciones del año. Concluyen que no hay diferencias entre fresco y congelado pero afirman que el rendimiento de la técnica de extracción empleada (orgánica) no ofrece los mismos rendimientos que en el semen del hombre, sino 25 veces inferiores en semen equino. Este bajo rendimiento coincide con la baja cantidad de ARN obtenido en este trabajo por lo que el factor especie puede que sea determinante para poner a punto una técnica de extracción de ARN más eficiente.

El campo de la expresión génica en semen está más estudiado en medicina humana, se han publicado trabajos en los que usan como genes de referencia *GAPDH* (Carreau et al. 2009; Cavalcanti et al. 2011), *ACTB* (Lima et al. 2006; Ferlin et al. 2010; Cavalcanti et al. 2011, Amoako et al. 2013), *Ciclofilina A* (Del Giudice et al. 2010), *Proteína de choque térmico90 (HSP90, antes llamada HSPCB)*, *Adenosín Trifosfato subunidad 5 beta (ATP5B)* (Cavalcanti et al. 2011) y *Beta-2-microglobulina (B2M)* (Amoako et al. 2013).

En équidos existen varios trabajos en los que estudian un grupo de genes candidatos para el estudio de la expresión génica en determinadas patologías o grupo de células concretas. Los genes candidatos en este estudio son frecuentemente empleados como genes de referencia (Bogaert et al. 2006; Cappelli et al. 2008; Smits et al. 2009; Zhang et al. 2009; Brooks & Bailey 2010). Por el contrario hay pocos trabajos sobre expresión genética en semen equino criopreservado. Wrench y col. (2010) tipifican el ARNm de la *ACTB* y *GADPH* para demostrar la inexistencia de ARNm de la *proteína SP22*, aunque no realizan un estudio de expresión diferencial propiamente dicho. En 2010 Das y col. realizan un estudio de extracción de ARN en semen equino fresco, congelado sin crioprotectores y refrigerado con diluyentes. Y posteriormente, en 2013, lo completan con un estudio de *microarray* en el que comparan los transcriptomas de semen fresco de cinco sementales con cuatro biopsias testiculares, y realiza la validación con una RT-qPCR en la que utiliza como genes de referencia *ACTB* y *PPIA (Peptidilprolil isomerasa α)*. El único estudio de selección de genes de referencia en semen equino criopreservado es el originado por este trabajo y publicado en 2014 (Pérez-Rico et al. 2014).

El gen *HSP90* es usado como gen de referencia en trabajos que utilizan como muestra semen humano (Ferlin et al. 2010; Steilmann et al. 2010; Cavalcanti et al. 2011), en este estudio se determina que no es adecuado para ser usados como gen de referencia por su baja eficiencia y problemas en la amplificación, además de presentar la menor estabilidad de expresión.

El gen *SDHA* que también tiene problemas en la amplificación y su eficiencia es baja, es usado como gen de referencia en diferentes tejidos de équidos (Cappelli et al. 2008; Smits et al. 2009; Beekman et al. 2011). En este estudio no es seleccionado como gen de referencia por ser el segundo gen menos estable en la expresión.

El gen *H2AI*, utilizado como gen de referencia en blastocistos equinos (Smits et al. 2009), presenta una buena amplificación pero en la curva de fusión se pone de manifiesto la amplificación de algunos dímeros. A pesar de tener una estabilidad adecuada no se selecciona como gen de referencia para el estudio de expresión genética en semen equino, porque es una proteína muy implicada en el empaquetamiento de la cromatina.

El gen *GAPDH* usado en trabajos de expresión en semen fresco humano (Steilmann et al. 2010; Cavalcanti et al. 2011), semen bovino (Bissonnette et al. 2009, Abavisani et al. 2011), en tejido testicular equino (Herrera-Luna et al. 2012) e incluso en espermatozoides equinos (Ing et al. 2014), ha tenido que ser descartado porque aunque se ha amplificado correctamente, amplifica algunos dímeros. Este gen junto con la *ACTB* son ampliamente utilizados como genes de referencia en trabajos de expresión, pero existe un estudio en 2012 que los considera inadecuados para esta función por tener una gran cantidad de pseudogenes que nos dificultan discernir entre éstos y el ADNc (Sun et al. 2012). Proponen el diseño de cebadores específicos que distingan el ARNm de los pseudogenes, pero no en todos los casos es posible, Sun *et al.* encuentran problemas en el diseño para *GAPDH*.

De los nueve genes estudiados, cinco (*ACTB*, *ATP5B*, *PRM1*, *RPL32* y *UBQ*) presentan buenas características de amplificación, eficiencia y estabilidad, y los genes seleccionados como genes de referencia para estudios de expresión genética en semen equino deberían estar entre ellos.

Para poder comparar muestras, éstas deben estar normalizadas con genes de referencia internos que tengan una expresión constante bajo las condiciones del estudio, es decir, aquellos que sean más estables. Hay varios métodos disponibles para la

normalización precisa de la expresión génica mediante RT-qPCR (Vandesompele et al. 2002; Andersen, Jensen, y Ørntoft 2004), pero aún no hay un consenso generalizado dentro de la comunidad científica sobre qué método se debe utilizar. Por esa razón, es mejor utilizar una comparación de diferentes procedimientos de cálculo de selección de genes de referencia, así se puede llevar a cabo una mejor identificación de los controles más fiables y se reduce el riesgo de la selección artificial de los transcriptomas co-regulados (Ayers et al. 2007). Numerosos trabajos científicos coinciden en utilizar conjuntamente las aplicaciones *NORMFINDER*, *BESTKEEPER* y *GENORM* y comparar sus resultados para la selección de los genes de referencia. En caballos, Capelli (2008) y Beekman (2011) analizan genes de referencia en linfocitos y células de lavado broncoalveolar respectivamente, utilizando estas tres metodologías en su estudio. En este trabajo también se compararon los resultados mediante estas tres aplicaciones para evaluar los cinco genes de referencia candidatos, con el fin de seleccionar la combinación de los tres genes con mejor estabilidad para poder utilizarlos en estudios de expresión génica.

Las tres herramientas informáticas encuentran que todos los genes candidatos ofrecen buenos resultados de estabilidad, a excepción de *BESTKEEPER* que no considera adecuados los genes *PRMI* y *UBQ* por su desviación típica, aun así todos los programas coinciden en los tres genes que poseen mejor estabilidad. A la vista de estos resultados se concluye que se podrían utilizar como genes de referencia *ACTB*, *RPL32* y *ATP5b* en estudios de semen crioconservado equino, siendo estos genes de normalización adecuados incluso en trabajos realizados con semen de humanos (Steilmann et al. 2010; Cavalcanti et al. 2011; Marques et al. 2011).

Con el programa *REST 2009* se han encontrado algunas relaciones existentes entre parámetros de calidad seminal y los niveles de transcripción de los genes de interés que han sido descartados por tener una menor estabilidad.

El gen *SDHA* se interpreta que está infraexpresado en el grupo de baja motilidad progresiva. La *SDHA* es un complejo proteico que interviene en el ciclo de Krebs y la cadena de transferencia de electrones de la membrana de las mitocondrias para la producción de energía. Se ha demostrado que existe una correlación directa y positiva entre las actividades respiratorias mitocondriales y la motilidad de los espermatozoides (Ruiz-Pesini et al. 1998). Por tanto, un menor número de transcripciones de esta enzima, podría

afectar a la producción de energía mitocondrial en la pieza intermedia del espermatozoide y ser responsable de una menor motilidad progresiva.

El gen *UBQ* se interpreta que está sobreexpresado en los grupos con menor LIN y STR, que son los ratios que evalúan la linealidad y la rectitud en el movimiento del espermatozoide. La *UBQ* es una proteína reguladora, cuya función principal es dirigir el reciclaje de proteínas; se asocia a ellas y las marca para su destrucción en el proteosoma (Hershko 2005). La *UBQ* se ha definido como un marcador universal de anomalías morfológicas en el espermatozoide, mediante la detección de la misma en las proteínas de la superficie de espermatozoides defectuosos (Sutovsky et al. 2001). Una mayor expresión de *UBQ* nos estaría indicando la presencia de alteraciones morfológicas que pueden afectar al tipo de movimiento del espermatozoide maduro.

El gen *PRMI* se interpreta que está infraexpresado en los grupos con mayor fragmentación del ADN en el tiempo 0 y 4 horas postdescongelación. La *PRMI* interviene en el empaquetamiento de la cromatina durante el desarrollo del espermatozoide y es una proteína cuyo equilibrio con la *Protamina 2* tiene importancia en la fertilidad. Una de las posibles causas de daño en el ADN es por alteraciones en la remodelación de la cromatina durante el proceso de espermiogénesis (McPherson y Longo 1993; Sakkas et al. 1996), en el que las histonas son sustituidas por protaminas. La variabilidad en la estructura de la cromatina también se relaciona con el contenido en protaminas. En función de la cantidad de estas nucleoproteínas presentes en la estructura, habrá mayor o menor compactación. Por esta razón, una posible consecuencia de la expresión anormal de protamina es una mayor susceptibilidad al daño del ADN (Carrell et al. 2007). Y puesto que esta expresión diferencial es significativa en tiempo 0 y 4 horas postdescongelación, podría indicar que durante estas primeras 4 horas, la *PRMI* juega un papel importante en el proceso de fragmentación del ADN y que a partir de ese momento son otros factores los que adquieren mayor relevancia como causa de rotura del ADN.

El gen *GAPDH* está infraexpresado en los grupos con mayor fragmentación del ADN en el tiempo 0 y 6 horas postdescongelación. La *GAPDH* es una enzima implicada en una de las reacciones más importantes de la glucólisis (ruta de *Embden-Meyerhof*), puesto que cataliza un paso en el cual se genera el primer intermediario de elevada energía, y, además, genera un par de equivalentes de reducción (en forma de NADH). Concretamente,

existe una isoforma de esta enzima que tiene su expresión restringida únicamente durante la espermatogénesis (Welch et al. 1992; Bunch et al. 1998; Danshina et al. 2010). Toda la bibliografía al respecto habla sobre la implicación de esta enzima en la producción de energía para la motilidad de las células espermáticas y los procesos de capacitación, hiperactivación y penetración de la zona pelúcida (Fraser y Quinn 1981; Hoshi et al. 1991; Williams y Ford 2001; Danshina et al. 2010). Durante la espermiogénesis, también existe gasto de energía en el intercambio de histonas a protaminas, y un fallo en este paso daría como consecuencia una compactación incompleta de la cromatina, lo que podría ocasionar una mayor susceptibilidad a daños en el ADN. Otra posibilidad es que la disminución de *GAPDH* esté relacionada con una menor capacidad de las defensas naturales antioxidantes para actuar contra los ROS, que actúa como aceptor de radicales peróxido y superóxido, ocasionando una mayor fragmentación del ADN.

Conclusiones

1. Las dosis seminales criopreservadas de équidos permiten extraer ARN de calidad para abordar estudios de expresión genética.
2. El método de extracción propuesto permiten aislar ARN y es necesario realizar un tratamiento DNasa adicional para eliminar cualquier traza de ADN residual que pudiese desvirtuar los resultados que se obtengan en análisis posteriores, de todas formas se confirma que la extracción de ARN en semen equino es compleja y es necesario investigar nuevos protocolos que permitan una extracción con mayor rendimiento.
3. Se determina que los genes *ACTB*, *RPL32* y *ATP5b* son los mejores genes de referencia para espermatozoides equinos criopreservados de los analizados. El resto, a pesar de haber sido empleados en trabajos de expresión, no ofrecen unos resultados aceptables en este tipo celular.
4. Existe una expresión diferencial de algunos de los genes estudiados al relacionarlos con los parámetros de calidad seminal:
 - a. El nivel de transcripción del gen *SDHA* indica que se encuentra significativamente infraexpresado en los casos de baja motilidad progresiva.
 - b. El nivel de transcripción del gen *UBQ* indica que se encuentra significativamente sobreexpresado en los casos de menor LIN y STR.
 - c. Los niveles de transcripción de los genes *PRM1* y *GAPDH* indican que se encuentran significativamente infraexpresado en los casos de mayor fragmentación de la cromatina.

Bibliografía

- Abaigar, T, W V Holt, R A Harrison, y G del Barrio. 1999. «Sperm subpopulations in boar (*Sus scrofa*) and gazelle (*Gazella dama mhorr*) semen as revealed by pattern analysis of computer-assisted motility assessments». *Biology of Reproduction* 60 (1) (enero): 32-41.
- Agarwal, A, y S S R Allamaneni. 2004. «The effect of sperm DNA damage on assisted reproduction outcomes. A review». *Minerva Ginecologica* 56 (3): 235-45.
- Amann, Rupert P. 2008. «The cycle of the seminiferous epithelium in humans: a need to revisit?» *Journal of Andrology* 29 (5) (octubre): 469-487. doi:10.2164/jandrol.107.004655.
- Ambion Biosystems. 2008. «Use of Internal and External Standards or Reference RNAs for Accurate Quantitation of RNA Levels». <http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/References/Ambion-Tech-Support/northern-analysis/tech-notes/use-of-internal-and-external-standards-or-reference-rnas-for-accurate-quantitation-of-rna-levels.html>.
- Amoako, A. A., A. K. Gebeh, E. L. Marczylo, J. M. Willets, J. Elson, T. H. Marczylo, y J. C. Konje. 2013. «Impact of Reference Gene Selection for Type 2 Cannabinoid Receptor Gene Expression Studies in Human Spermatozoa». *Andrologia* 45 (4): 278-84. doi:10.1111/and.12006.
- Andersen, Claus Lindbjerg, Jens Ledet Jensen, y Torben Falck Ørntoft. 2004. «Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets». *Cancer Research* 64 (15) (agosto 1): 5245-5250. doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-0496.
- Avendano, C., A. Franchi, E. Jones, y S. Oehninger. 2009. «Pregnancy-specific -1-glycoprotein 1 and human leukocyte antigen-E mRNA in human sperm: differential expression in fertile and infertile men and evidence of a possible functional role during early development». *Human Reproduction* 24 (2) (febrero 1): 270-277. doi:10.1093/humrep/den381.
- Ayers, Duncan, Dylan N Clements, Fiona Salway, Philip JR Day. 2007. «Expression stability of commonly used reference genes in canine articular connective tissues». *BMC Veterinary Research* 3 (mayo 7): 7. doi:10.1186/1746-6148-3-7.
- Bannasch, Danika, Robert Tryon, y Stephen White. 2009. «Methods for detecting a cyclophilin B SNP associated with HERDA». Oakland, CA. <http://www.patentgenius.com/patent/7608400.html>.
- Beekman, Laura, Triin Tohver, Rkia Dardari, y Renaud Léguillette. 2011. «Evaluation of suitable reference genes for gene expression studies in bronchoalveolar lavage cells from horses with inflammatory airway disease». *BMC Molecular Biology* 12: 5. doi:10.1186/1471-2199-12-5.
- Bissonnette, Nathalie, Jean-Philippe Lévesque-Sergerie, Catherine Thibault, y Guylain Boissonneault. 2009. «Spermatozoal transcriptome profiling for bull sperm motility: a potential tool to evaluate semen quality». *Reproduction (Cambridge, England)* 138 (1) (julio): 65-80. doi:10.1530/REP-08-0503.

- Bogaert, Lies, Mario Van Poucke, Cindy De Baere, Luc Peelman, Frank Gasthuys, y Ann Martens. 2006. «Selection of a set of reliable reference genes for quantitative real-time PCR in normal equine skin and in equine sarcoids». *BMC Biotechnology* 6 (abril 27): 24. doi:10.1186/1472-6750-6-24.
- Braude, P, V Bolton, y S Moore. 1988. «Human gene expression first occurs between the four- and eight-cell stages of preimplantation development». *Nature* 332 (6163) (marzo 31): 459-461. doi:10.1038/332459a0.
- Brooks, S. A, y E. Bailey. 2010. «RT-qPCR Comparison of Mast Cell Populations in Whole Blood from Healthy Horses and Those with Laminitis». *Animal Genetics* 41 (diciembre 1): 16-22. doi:10.1111/j.1365-2052.2010.02093.x.
- Bunch, D. O., J. E. Welch, P. L. Magyar, E. M. Eddy, y D. A. O'Brien. 1998. «Glyceraldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase-S Protein Distribution during Mouse Spermatogenesis.» *Biology of Reproduction* 58 (3): 834-41. doi:10.1095/biolreprod58.3.834.
- Bustin, S A. 2005. «Real-Time PCR». En *Encyclopedia of Diagnostic Genomics and Proteomics*, M.Podda & J.Fuchs, 1131-1135. New York: Marcel Dekker.
- Bustin, S A, V Benes, T Nolan, y M W Pfaffl. 2005. «Quantitative real-time RT-PCR--a perspective». *Journal of Molecular Endocrinology* 34 (3) (junio): 597-601. doi:10.1677/jme.1.01755.
- Bustin, S A, y T Nolan. 2004. «Analysis of mRNA Expression by Real-Time PCR.» En *Real-Time PCR; An Essential Guide.*, K.J.Edwards el al., 125-184. Wymondham: Horizon Bioscience.
- Bustin, Stephen A, Vladimir Benes, Jeremy A Garson, Jan Hellemans, Jim Huggett, Mikael Kubista, Reinhold Mueller, et al. 2009. «The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments». *Clinical Chemistry* 55 (4) (abril): 611-622. doi:10.1373/clinchem.2008.112797.
- Bustin, Stephen A, y Tania Nolan. 2004. «Pitfalls of quantitative real-time reverse-transcription polymerase chain reaction». *Journal of Biomolecular Techniques: JBT* 15 (3) (septiembre): 155-166.
- Cappelli, Katia, Michela Felicetti, Stefano Capomaccio, Giacomo Spinsanti, Maurizio Silvestrelli, y Andrea Verini Supplizi. 2008. «Exercise induced stress in horses: selection of the most stable reference genes for quantitative RT-PCR normalization». *BMC Molecular Biology* 9: 49. doi:10.1186/1471-2199-9-49.
- Carreau, Serge, Christelle Delalande, y Isabelle Galeraud-Denis. 2009. «Mammalian sperm quality and aromatase expression». *Microscopy Research and Technique* 72 (8) (agosto): 552-557. doi:10.1002/jemt.20703.
- Carrell, Douglas T., Benjamin R. Emery, y Sue Hammoud. 2007. «Altered Protamine Expression and Diminished Spermatogenesis: What Is the Link?» *Human Reproduction Update* 13 (3): 313-27. doi:10.1093/humupd/dml057.
- Cavalcanti, M C O, K Failling, H C Schuppe, M Bergmann, T Stalf, W Weidner, y K Steger. 2011. «Validation of reference genes in human testis and ejaculate». *Andrologia* 43 (5) (octubre): 361-367. doi:10.1111/j.1439-0272.2010.01076.x.

- Chanapiwat, P, GJ Rho, P Tummaruk, y K Kaeoket. 2011. «Sperm parameters and gene expression of boar spermatozoa following cooling and freezing process.» En Pattaya, Thainaldia. <http://www.apvs2011.com/context/papers/oral/OR023.pdf>.
- Chen, Xiaoli, Yonggui Wang, Huabin Zhu, Haisheng Hao, Xueming Zhao, Tong Qin, y Dong Wang. 2014. «Comparative transcript profiling of gene expression of fresh and frozen-thawed bull sperm». *Theriogenology*. doi:10.1016/j.theriogenology.2014.10.015.
- Christensen, P., Stryhn, H., Hansen, C., 2005, «Discrepancies in the determination of sperm concentration using Bürker-Türk, Thoma and Makler counting chambers». *Theriogenology* 63, 992-1003.
- Colenbrander B, Gadella BM, Stout TA. 2003. «The predictive value of semen analysis in the evaluation of stallion fertility». *Reproduction in Domestic Animals*; 38:305–11.
- Cortés-Gutiérrez, E. I., Crespo, F., Gosálvez, A., Dávila-Rodríguez, M. I., López-Fernández, C., & Gósalvez, J. 2008. «DNA fragmentation in frozen sperm of *Equus asinus*: Zamorano-Leonés, a breed at risk of extinction». *Theriogenology*, 69(8), 1022-1032.
- D'Occhio, M. J., Hengstberger, K. J., & Johnston, S. D. 2007. «Biology of sperm chromatin structure and relationship to male fertility and embryonic survival». *Animal reproduction science*, 101(1), 1-17.
- Danshina, Polina V., Christopher B. Geyer, Qunsheng Dai, Eugenia H. Goulding, William D. Willis, G. Barrie Kitto, John R. McCarrey, E. M. Eddy, y Deborah A. O'Brien. 2010. «Phosphoglycerate Kinase 2 (PGK2) Is Essential for Sperm Function and Male Fertility in Mice». *Biology of Reproduction* 82 (1): 136-45. doi:10.1095/biolreprod.109.079699.
- Das, Pranab J., Fiona McCarthy, Monika Vishnoi, Nandina Paria, Cathy Gresham, Gang Li, Priyanka Kachroo, et al. 2013. «Stallion Sperm Transcriptome Comprises Functionally Coherent Coding and Regulatory RNAs as Revealed by Microarray Analysis and RNA-seq». *PLoS ONE* 8 (2): e56535. doi:10.1371/journal.pone.0056535.
- Das, Pranab J, Nandina Paria, Ashley Gustafson-Seabury, Monika Vishnoi, Sankar P Chaki, Charles C Love, Dickson D Varner, Bhanu P Chowdhary, y Terje Raudsepp. 2010. «Total RNA isolation from stallion sperm and testis biopsies». *Theriogenology* 74 (6) (octubre 1): 1099-1106, 1106e1-2. doi:10.1016/j.theriogenology.2010.04.023.
- Del Giudice, Paula Toni, Samira Barbosa Lima, Marcos Antonio Cenedeze, Álvaro Pacheco-Silva, Ricardo Pimenta Bertolla, y Agnaldo Pereira Cedenho. 2010. «Expression of the Fas-ligand gene in ejaculated sperm from adolescents with and without varicocele». *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 27 (2-3): 103-9. doi:10.1007/s10815-010-9384-9.
- Devlin, TM. 2004. *Bioquímica*. 4ª edición. Barcelona: Reverté.
- Dorak, M. Tevfik. 2008. «Real-Time PCR». *Real-Time PCR*. <http://dorakmt.tripod.com/genetics/realtime.html>.

- Dott, H. M., y G. C. A. Foster. 1979. «The estimation of sperm motility in semen, on a membrane slide, by measuring the area change frequency with an image analysing computer». *Journal of Reproduction and Fertility* 55 (1) (enero 1): 161 -166. doi:10.1530/jrf.0.0550161.
- Dowsett, K F, y L M Knott. 1996. «The influence of age and breed on stallion semen». *Theriogenology* 46 (3) (agosto): 397-412.
- Dussault, Andrée-Anne, y Marc Pouliot. 2006. «Rapid and simple comparison of messenger RNA levels using real-time PCR». *Biological Procedures Online* 8: 1-10. doi:10.1251/bpo114.
- Edwards, KJ. 2004. «Performing Real-Time PCR.» En *Real-Time PCR; An Essential Guide.*, K.J.Edwards et al., 71-84. Wymondham: Horizon Bioscience.
- Erenpreiss, Juris, Solveiga Hlevicka, Janis Zalkalns, y Jekaterina Erenpreisa. 2002. «Effect of leukocytospermia on sperm DNA integrity: a negative effect in abnormal semen samples». *Journal of Andrology* 23 (5): 717-23.
- Evenson, D P. 1999. «Loss of livestock breeding efficiency due to uncompensable sperm nuclear defects». *Reproduction, Fertility, and Development* 11 (1): 1-15.
- Evenson, D. P., & Melamed, M. R. 1983. «Rapid analysis of normal and abnormal cell types in human semen and testis biopsies by flow cytometry». *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 31(1A Suppl), 248-253.
- Evenson, DP, Z Darzynkiewicz, y MR Melamed. 1980. «Relation of mammalian sperm chromatin heterogeneity to fertility». *Science* 210 (4474): 1131 -1133. doi:10.1126/science.7444440.
- Farlin, M E, D J Jasko, J K Graham, y E L Squires. 1992. «Assessment of Pisum sativum agglutinin in identifying acrosomal damage in stallion spermatozoa». *Molecular Reproduction and Development* 32 (1): 23-27. doi:10.1002/mrd.1080320105.
- Ferlin, Alberto, Elena Speltra, Cristina Patassini, Mauro A Pati, Andrea Garolla, Nicola Caretta, y Carlo Foresta. 2010. «Heat shock protein and heat shock factor expression in sperm: relation to oligozoospermia and varicocele». *The Journal of Urology* 183 (3) (marzo): 1248-1252. doi:10.1016/j.juro.2009.11.009.
- Fernández, J L, F Vázquez-Gundín, A Delgado, V J Goyanes, J Ramiro-Díaz, J de la Torre, y J Gosálvez. 2000. «DNA breakage detection-FISH (DBD-FISH) in human spermatozoa: technical variants evidence different structural features». *Mutation Research* 453 (1): 77-82.
- Fernández, José Luis, Lourdes Muriel, Vicente Goyanes, Enrique Segrelles, Jaime Gosálvez, María Enciso, Marie LaFromboise, y Christopher De Jonge. 2005. «Simple determination of human sperm DNA fragmentation with an improved sperm chromatin dispersion test». *Fertility and Sterility* 84 (4): 833-42. doi:10.1016/j.fertnstert.2004.11.089.
- Fraser, Lynn R., y P. J. Quinn. 1981. «A Glycolytic Product Is Obligatory for Initiation of the Sperm Acrosome Reaction and Whiplash Motility Required for Fertilization in the Mouse». *Journal of Reproduction and Fertility* 61 (1): 25-35. doi:10.1530/jrf.0.0610025.

- Gadea, J.; Sellés. 2001. «The value of boar semen analysis under commercial farm conditions, El valor del análisis seminal porcino en las condiciones de explotación comercial». *ITEA* (no.especial 22(2)): 829-831.
- Gadella, B M. 2008. «The assembly of a zona pellucida binding protein complex in sperm». *Reproduction in Domestic Animals = Zuchthygiene* 43 Suppl 5 (noviembre): 12-19. doi:10.1111/j.1439-0531.2008.01255.x.
- Gadella, B M, F M Flesch, L M van Golde, y B Colenbrander. 1999. «Dynamics in the membrane organization of the mammalian sperm cell and functionality in fertilization». *The Veterinary Quarterly* 21 (4) (octubre): 142-146.
- Ganguly, Indrajit, G. K. Gaur, Sushil Kumar, D. K. Mandal, Mahesh Kumar, Umesh Singh, Sunil Kumar, y Arjava Sharma. 2013. «Differential expression of protamine 1 and 2 genes in mature spermatozoa of normal and motility impaired semen producing crossbred Frieswal (HF × Sahiwal) bulls». *Research in Veterinary Science* 94 (2): 256-62. doi:10.1016/j.rvsc.2012.09.001.
- Gamboa, S., Rodrigues, A.S., Henriques, L., Batista, C., Ramalho-Santos, J., 2010, «Seasonal functional relevance of sperm characteristics in equine spermatozoa». *Theriogenology* 73, 950-958.
- Garner, D L, D Pinkel, L A Johnson, y M M Pace. 1986. «Assessment of spermatozoal function using dual fluorescent staining and flow cytometric analyses». *Biology of Reproduction* 34 (1): 127-38.
- Giwerzman, A., Richthoff, J., Hjøllund, H., Bonde, J. P., Jepson, K., Frohm, B., & Spano, M. 2003. «Correlation between sperm motility and sperm chromatin structure assay parameters». *Fertility and sterility*, 80(6), 1404-1412.
- Giglio, Steven, Paul T. Monis, y Christopher P. Saint. 2003. «Demonstration of preferential binding of SYBR Green I to specific DNA fragments in real-time multiplex PCR». *Nucleic Acids Research* 31 (22) (noviembre 15): e136. doi:10.1093/nar/gng135.
- Gong, Z. K., Wang, S. J., Huang, Y. Q., Zhao, R. Q., Zhu, Q. F., y Lin, W. Z. 2014. «Identification and validation of suitable reference genes for RT-qPCR analysis in mouse testis development». *Molecular Genetics and Genomics*: 1-13.
- Goodrich, Robert J., Ester Anton, y Stephen A. Krawetz. 2013. «Isolating mRNA and Small Noncoding RNAs from Human Sperm». En *Spermatogenesis*, editado por Douglas T. Carrell y Kenneth I. Aston, 385-96. *Methods in Molecular Biology* 927. Humana Press. http://link.springer.com/protocol/10.1007/978-1-62703-038-0_33.
- Goodrich, Robert, Graham Johnson, y Stephen A. Krawetz. 2007. «The Preparation of Human Spermatozoal RNA for Clinical Analysis». *Systems Biology in Reproductive Medicine* 53 (3): 161-67. doi:10.1080/01485010701216526.
- Goodwin, L O, D S Karabinus, R G Pergolizzi, y S Benoff. 2000. «L-type voltage-dependent calcium channel alpha-1C subunit mRNA is present in ejaculated human spermatozoa». *Molecular human reproduction* 6 (2) (febrero): 127-136.
- Gorczyca, W, J Gong, y Z Darzynkiewicz. 1993. «Detection of DNA strand breaks in individual apoptotic cells by the in situ terminal deoxynucleotidyl transferase and nick translation assays». *Cancer Research* 53 (8): 1945-51.

- Gosálvez Berenguer, J., Caballero Peregrín, P., López-Fernández, C., Fernández, J. L., & Núñez Calonge, R. 2008. «Fragmentación del ADN espermático». *Revista Internacional de Andrología*, 6(3), 193-209.
- Gosálvez, J., Cortés-Gutierrez, E., López-Fernández, C., Fernández, J. L., Caballero, P., & Nuñez, R. 2009. «Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation dynamics in fertile donors». *Fertility and sterility*, 92(1), 170-173.
- Graham, J K. 2001. «Assessment of sperm quality: a flow cytometric approach». *Animal Reproduction Science* 68 (3-4): 239-47.
- Grunewald, Sonja, Thomas Baumann, Uwe Paasch, y Hans-Juergen Glander. 2006. «Capacitation and acrosome reaction in nonapoptotic human spermatozoa». *Annals of the New York Academy of Sciences* 1090 (diciembre): 138-146. doi:10.1196/annals.1378.015.
- Gur, Y., and Breitbart, H. 2006. «Mammalian sperm translate nuclear-encoded proteins by mitochondrial-type ribosomes». *Genes & Development* 20 (4) (febrero 15): 411-416. doi:10.1101/gad.367606.
- Hammerstedt R.H. 1996. «Evaluation of sperm quality: Identification of the subfertile male and courses of action». *Animal Reproduction Science* 42 (1): 77-87. doi:10.1016/0378-4320(96)01535-7.
- Hermann, T, y D J Patel. 2000. «RNA bulges as architectural and recognition motifs». *Structure (London, England: 1993)* 8 (3) (marzo 15): R47-54.
- Herrera-Luna, Cv, S Budik, y C Aurich. 2012. «Gene Expression of ACTH, Glucocorticoid Receptors, 11 β HSD Enzymes, LH-, FSH-, GH Receptors and Aromatase in Equine Epididymal and Testicular Tissue». *Reproduction in Domestic Animals* 47 (6): 928–935. doi:10.1111/j.1439-0531.2012.01993.x.
- Hershko, A. 2005. «The Ubiquitin System for Protein Degradation and Some of Its Roles in the Control of the Cell Division Cycle*». *Cell Death & Differentiation* 12 (9): 1191-97. doi:10.1038/sj.cdd.4401702.
- Higuchi, Russell, Carita Fockler, Gavin Dollinger, y Robert Watson. 1993. «Kinetic PCR Analysis: Real-time Monitoring of DNA Amplification Reactions». *Nat Biotech* 11 (9): 1026-1030. doi:10.1038/nbt0993-1026.
- Holt, WV, y AR Pickard. 1999. «Role of reproductive technologies and genetic resource banks in animal conservation». *Rev Reprod* 4 (3) (septiembre 1): 143-150. doi:10.1530/ror.0.0040143.
- Hoshi, Kazuhiko, Susumu Tsukikawa, y Akira Sato. 1991. «Importance of Ca²⁺, K⁺ and Glucose in the Medium for Sperm Penetration through the Human Zona Pellucida.» *The Tohoku Journal of Experimental Medicine* 165 (2): 99-104. doi:10.1620/tjem.165.99.
- Huggett, J, K Dheda, S Bustin, y A Zumla. 2005. «Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations». *Genes and Immunity* 6 (4) (junio): 279-284. doi:10.1038/sj.gene.6364190.
- Ing, N. H., D. W. Forrest, C. C. Love, y D. D. Varner. 2014. «Dense spermatozoa in stallion ejaculates contain lower concentrations of mRNAs encoding the sperm specific calcium channel 1, ornithine decarboxylase antizyme 3, aromatase, and

- estrogen receptor alpha than less dense spermatozoa». *Theriogenology* 82 (2): 347-53. doi:10.1016/j.theriogenology.2014.04.016.
- Jasko DJ. «Evaluation of stallion semen». In: T.L. Blanchard and D.D. Varner (eds). *The Veterinary Clinics of North America, Equine Practice, Stallion Management*. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1992; 129-148.
- Jodar, Meritxell, Susana Kalko, Judit Castillo, Josep Lluís Ballejà, y Rafael Oliva. 2012. «Differential RNAs in the Sperm Cells of Asthenozoospermic Patients». *Human Reproduction* 27 (5): 1431-38. doi:10.1093/humrep/des021.
- Johnson, L A, K F Weitze, P Fiser, y W M Maxwell. 2000. «Storage of boar semen». *Animal Reproduction Science* 62 (1-3) (agosto 18): 143-172.
- Johnson, Larry, Donald L Thompson Jr, y Dickson D Varner. 2008. «Role of Sertoli cell number and function on regulation of spermatogenesis». *Animal Reproduction Science* 105 (1-2) (abril): 23-51. doi:10.1016/j.anireprosci.2007.11.029.
- Kawano, Mitsuoki, Hideya Kawaji, Valérie Grandjean, Jafar Kiani, y Mino Rassoulzadegan. 2012. «Novel Small Noncoding RNAs in Mouse Spermatozoa, Zygotes and Early Embryos». *PLoS ONE* 7 (9): e44542. doi:10.1371/journal.pone.0044542.
- Katila, T. (2001). «In vitro evaluation of frozen-thawed stallion semen: A review». *Acta Veterinaria Scandinavica*, 42(2), 199-218.
- Kriegova, Eva, Arsen Arakelyan, Regina Fillerova, Jaromir Zatloukal, Frantisek Mrazek, Zdenka Navratilova, Vitezslav Kolek, Roland M du Bois, y Martin Petrek. 2008. «PSMB2 and RPL32 are suitable denominators to normalize gene expression profiles in bronchoalveolar cells». *BMC Molecular Biology* 9 (julio 31): 69. doi:10.1186/1471-2199-9-69.
- Lalancette, C., C. Thibault, I. Bachand, N. Caron, y N. Bissonnette. 2008. «Transcriptome Analysis of Bull Semen with Extreme Nonreturn Rate: Use of Suppression-Subtractive Hybridization to Identify Functional Markers for Fertility». *Biology of Reproduction* 78 (4) (abril 1): 618 -635. doi:10.1095/biolreprod.106.059030.
- Lambard, S., I. Galeraud-Denis, G. Martin, R. Levy, A. Chocat, y S. Carreau. 2004. «Analysis and significance of mRNA in human ejaculated sperm from normozoospermic donors: relationship to sperm motility and capacitation». *Molecular Human Reproduction* 10 (7) (julio 1): 535 -541. doi:10.1093/molehr/gah064.
- Lee, MA, DJ Squirrell, DL Leslie, y T Brown. 2004. «Homogeneous Fluorescent Chemistries.» En *Real-Time PCR; An Essential Guide.*, K.J.Edwards et al., 31-70. Wymondham: Horizon Bioscience.
- Lee, Peter D, Robert Sladek, Celia M T Greenwood, y Thomas J Hudson. 2002. «Control genes and variability: absence of ubiquitous reference transcripts in diverse mammalian expression studies». *Genome Research* 12 (2) (febrero): 292-297. doi:10.1101/gr.217802.
- Li, Chunjin, Yongfeng Sun, Kangle Yi, Chengjiao Li, Xiaoling Zhu, Lu Chen, y Xu Zhou. 2011. «Detection of the SRY Transcript and Protein in Bovine Ejaculated

Spermatozoa». *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences* 24: 1358-1364. doi:10.5713/ajas.2011.11062.

- Lima, Samira Barbosa, Marcos Antonio Cenedeze, Ricardo Pimenta Bertolla, Pericles Assad Hassun Filho, Sergio Oehninger, y Agnaldo Pereira Cedenho. 2006. «Expression of the HSPA2 gene in ejaculated spermatozoa from adolescents with and without varicocele». *Fertility and Sterility* 86 (6) (diciembre): 1659-1663. doi:10.1016/j.fertnstert.2006.05.030.
- Liu, D Y, y H W Baker. 1988. «The proportion of human sperm with poor morphology but normal intact acrosomes detected with *Pisum sativum* agglutinin correlates with fertilization in vitro». *Fertility and Sterility* 50 (2): 288-93.
- Livak, K J, y T D Schmittgen. 2001. «Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method». *Methods (San Diego, Calif.)* 25 (4) (diciembre): 402-408. doi:10.1006/meth.2001.1262.
- Lopes, S, J G Sun, A Jurisicova, J Meriano, y R F Casper. 1998. «Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation is increased in poor-quality semen samples and correlates with failed fertilization in intracytoplasmic sperm injection». *Fertility and Sterility* 69 (3): 528-32.
- López-Fernández, C., F. Crespo, F. Arroyo, J. L. Fernández, P. Arana, S. D. Johnston, y J. Gosálvez. 2007. «Dynamics of sperm DNA fragmentation in domestic animals: II. The stallion». *Theriogenology* 68 (9): 1240-50. doi:10.1016/j.theriogenology.2007.08.029.
- López-Fernández, C., Fernández, J. L., Gosálbez, A., Arroyo, F., Vázquez, J. M., Holt, W. V., & Gosálvez, J. 2008. «Dynamics of sperm DNA fragmentation in domestic animals: III. Ram». *Theriogenology*, 70(6), 898-908.
- Love, C.C., 2012, «Measurement of Concentration and Viability in Stallion Sperm». *Journal of Equine Veterinary Science* 32, 464-466.
- Lu, J., Lü, N., Huang, Y., Li, P.S., Fisch, H., 2004, Quality evaluation of three different sperm counting chambers. *Zhonghua nan ke xue = National journal of andrology* 10, 755-757, 760.
- Madsen, M, y P Christensen. 1995. «Bacterial flora of semen collected from Danish warmblood stallions by artificial vagina». *Acta Veterinaria Scandinavica* 36 (1): 1-7.
- Magistrini, M, y E Palmer. 1991. «Motility, triple stain and electron microscopic analysis of spermatozoa treated with ionophore A23187 for in vitro fertilization». *Journal of Reproduction and Fertility* Suppl. 44: 661-63.
- Mallona González, Izaskun. 2008. «Selección de genes de normalización para RT-PCR cuantitativa en *Petunia Hybrida*», septiembre. <http://repositorio.bib.upct.es:8080/dspace/handle/10317/723>.
- Malmgren, L. 1997. «Assessing the quality of raw semen: a review». *Theriogenology*, 48(4), 523-530.
- Marques, C Joana, Maria João Pinho, Filipa Carvalho, Ivan Bièche, Alberto Barros, y Mário Sousa. 2011. «DNA methylation imprinting marks and DNA

- methyltransferase expression in human spermatogenic cell stages». *Epigenetics: official journal of the DNA Methylation Society* 6 (11) (noviembre): 1354-1361. doi:10.4161/epi.6.11.17993.
- Martínez, Ivan Núñez, Jose María Morán, y Fernando J Peña. 2006. «Two-step cluster procedure after principal component analysis identifies sperm subpopulations in canine ejaculates and its relation to cryoresistance». *Journal of Andrology* 27 (4) (agosto): 596-603. doi:10.2164/jandrol.05153.
- Martinez-Pastor, Felipe, Vanesa Garcia-Macias, Mercedes Alvarez, Paz Herraez, Luis Anel, y Paulino de Paz. 2005. «Sperm Subpopulations in Iberian Red Deer Epididymal Sperm and Their Changes Through the Cryopreservation Process». *Biology of Reproduction* 72 (2) (febrero 1): 316 -327. doi:10.1095/biolreprod.104.032730.
- McPherson, Sandra M. G., y Frank J. Longo. 1993. «Nicking of Rat Spermatid and Spermatozoa DNA: Possible Involvement of DNA Topoisomerase II». *Developmental Biology* 158 (1): 122-30. doi:10.1006/dbio.1993.1173.
- Mikkola, Satu, Eeva Stenman, Kirsi Nurmi, Esmail Yousefi-Salakdeh, Roger Strömberg, y Harri Lönnberg. 1999. «The Mechanism of the Metal Ion Promoted Cleavage of RNA Phosphodiester Bonds Involves a General Acid Catalysis by the Metal Aquo Ion on the Departure of the Leaving Group». *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* (8) (enero 1): 1619-1626. doi:10.1039/A903691A.
- Miteva, K, N Valkov, J Goncharova-Peinova, K Kovachev, S Zlatarev, G Pironcheva, y G Russev. 1995. «Electron microscopic demonstration of transcription of ram sperm chromatin». *Microbios* 84 (339): 91-96.
- Mocé, E., Graham, J.K., 2008, «In vitro evaluation of sperm quality». *Animal Reproduction Science* 105, 104-118.
- Morris, G J. 2006. «Rapidly cooled human sperm: no evidence of intracellular ice formation». *Human Reproduction (Oxford, England)* 21 (8) (agosto): 2075-2083. doi:10.1093/humrep/del116.
- Morris, G J, K Faszer, J E Green, D Draper, B W W Grout, y F Fonseca. 2007. «Rapidly cooled horse spermatozoa: loss of viability is due to osmotic imbalance during thawing, not intracellular ice formation». *Theriogenology* 68 (5) (septiembre 15): 804-812. doi:10.1016/j.theriogenology.2007.06.009.
- Mortimer, S T. 2000. «CASA--practical aspects». *Journal of Andrology* 21 (4) (agosto): 515-524.
- Mortimer, ST. 1997. «A critical review of the physiological importance and analysis of sperm movement in mammals». *Human Reproduction Update* 3 (5): 403 -439. doi:10.1093/humupd/3.5.403.
- Naz, R K. 1998. «Effect of actinomycin D and cycloheximide on human sperm function». *Archives of Andrology* 41 (2) (octubre): 135-142.
- Nissen, Poul, Jeffrey Hansen, Nenad Ban, Peter B. Moore, y Thomas A. Steitz. 2000. «The Structural Basis of Ribosome Activity in Peptide Bond Synthesis». *Science* 289 (5481): 920 -930. doi:10.1126/science.289.5481.920.

- Oettlé, E. E. 1986. «Changes in acrosome morphology during cooling and freezing of dog semen». *Animal Reproduction Science* 12 (2): 145-50.
- Ohl, Falk, Monika Jung, Chuanliang Xu, Carsten Stephan, Anja Rabien, Mick Burkhardt, Andreas Nitsche, et al. 2005. «Gene expression studies in prostate cancer tissue: which reference gene should be selected for normalization?» *Journal of Molecular Medicine (Berlin, Germany)* 83 (12) (diciembre): 1014-1024. doi:10.1007/s00109-005-0703-z.
- Ortega-Ferrusola, C, Y Sotillo-Galán, E Varela-Fernández, J M Gallardo-Bolaños, A Muriel, L González-Fernández, J A Tapia, y F J Peña. 2008. «Detection of “apoptosis-like” changes during the cryopreservation process in equine sperm». *Journal of Andrology* 29 (2) (abril): 213-221. doi:10.2164/jandrol.107.003640.
- Ostermeier, David J Dix, David Miller, Purvesh Khatri, BE, Stephen A Krawetz 2002. «Spermatozoal RNA profiles of normal fertile men» *The Lancet*. Volume 360, Issue 9335, 7 September 2002, Pages 772–777
- Ostermeier, G Charles, Robert J Goodrich, Michael P Diamond, David J Dix, y Stephen A Krawetz. 2005. «Toward using stable spermatozoal RNAs for prognostic assessment of male factor fertility». *Fertility and Sterility* 83 (6) (junio): 1687-1694. doi:10.1016/j.fertnstert.2004.12.046.
- Papa, FO, SD Bicudo, y AF Moreira. 1989. «Metodo de coloração espermática na avaliação do sêmen descongelado.» *Revista Brasileira de Reproducción Animal*.
- Pérez-Rico, A., F. Crespo, M. L. Sanmartín, A. De Santiago, y J. L. Vega-Pla. 2014. «Determining ACTB, ATP5B and RPL32 as optimal reference genes for quantitative RT-PCR studies of cryopreserved stallion semen». *Animal Reproduction Science* 149 (3–4): 204-11. doi:10.1016/j.anireprosci.2014.08.007.
- Petrunkina, A.M., Harrison, R.A.P., 2011, «Cytometric solutions in veterinary andrology: Developments, advantages, and limitations». *Cytometry Part A* 79 A, 338-348.
- Pfaffl, M W. 2001. «A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR». *Nucleic Acids Research* 29 (9) (mayo 1): e45.
- Pfaffl. 2004. «Quantification Strategies In Real-Time PCR». En *A-Z of Quantitative PCR*, S.A.Bustin, 87-120. La Jolla: International University Line.
- Pfaffl. 2008. «Gene-Quantification.info - The reference in qPCR - Academic & Industrial Information Platform». <http://www.gene-quantification.de/>.
- Pfaffl, Michael W, Graham W Horgan, y Leo Dempfle. 2002. «Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR». *Nucleic Acids Research* 30 (9) (mayo 1): e36.
- Pickett, B.W., Voss, J.L., Bowen, R.A., Squires, E.L., McKinnon, A.O., 1988, Seminal characteristics and total scrotal width (T.S.W.) of normal and abnormal stallions. *Proceedings of the annual convention – American Association of Equine Practitioners*, 487-518.
- Pickett, BW. 1993. «Reproductive evaluation of the stallion». En *Equine Reproduction*, McKinnon AO, Voss JL, 755-768. Philadelphia, London: Lea and Febiger.

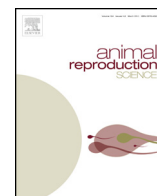
- Quintero-Moreno, A, J Miró, A Teresa Rigau, y J E Rodríguez-Gil. 2003. «Identification of sperm subpopulations with specific motility characteristics in stallion ejaculates». *Theriogenology* 59 (9) (mayo): 1973-1990.
- Restrepo Betancur, G., Úsuga Suárez, A., and Rojano, B. A. 2013. «Techniques for analyzing the potential fertility of stallion semen». *Revista CES Medicina Veterinaria y Zootecnia* 8 (1): 69-81.ª.
- Ririe, K M, R P Rasmussen, y C T Wittwer. 1997. «Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction». *Analytical Biochemistry* 245 (2) (febrero 15): 154-160. doi:10.1006/abio.1996.9916.
- Robinson, T L, I A Sutherland, y J Sutherland. 2007. «Validation of candidate bovine reference genes for use with real-time PCR». *Veterinary Immunology and Immunopathology* 115 (1-2) (enero 15): 160-165. doi:10.1016/j.vetimm.2006.09.012.
- Rossi, John J. 2004. «Ribozyme diagnostics comes of age». *Chemistry & Biology* 11 (7) (julio): 894-895. doi:10.1016/j.chembiol.2004.07.002.
- Ruiz-Pesini, Eduardo, Carmen Diez, Ana Cristina Lapeña, Acisclo Pérez-Martos, Julio Montoya, Enríque Alvarez, Joaquín Arenas, y Manuel J. López-Pérez. 1998. «Correlation of Sperm Motility with Mitochondrial Enzymatic Activities». *Clinical Chemistry* 44 (8): 1616-20.
- Rybar, R., Faldikova, L., Faldyna, M., Machatkova, M., & Rubes, J. 2004. «Bull and boar sperm DNA integrity evaluated by sperm chromatin structure assay in the Czech Republic». *Veterinarni Medicina-UZPI (Czech Republic)*.
- Sakkas, D., F. Urner, P. G. Bianchi, D. Bizzaro, I. Wagner, N. Jaquenoud, G. Manicardi, y A. Campana. 1996. «Sperm Chromatin Anomalies Can Influence Decondensation after Intracytoplasmic Sperm Injection». *Human Reproduction* 11 (4): 837-43.
- Salazar, Miguel, Oleg Y. Fedoroff, Julie M. Miller, N. Susan Ribeiro, y Brian R. Reid. 1993. «The DNA strand in DNA or RNA hybrid duplexes is neither B-form nor A-form in solution.» *Biochemistry* 32 (16): 4207-4215. doi:10.1021/bi00067a007.
- Samplaski, Mary K, Ashok Agarwal, Rakesh Sharma, y Edmund Sabanegh. 2010. «New generation of diagnostic tests for infertility: review of specialized semen tests.» *International journal of urology official journal of the Japanese Urological Association* 17 (10): 839-847. doi:10.1111/j.1442-2042.2010.02619.x.
- Scherf, B. 2000. *World Watch List for domestic animal diversity*. 1st edition. Roma: FAO. <http://www.fao.org/docrep/009/x8750e/x8750e00.HTM>.
- Shafeeque, C. M., R. P. Singh, S. K. Sharma, J. Mohan, K. V. H. Sastry, G. Kolluri, V. K. Saxena, J. S. Tyagi, J. M. Kataria, y P. A. Azeez. 2014. «Development of a new method for sperm RNA purification in the chicken». *Animal Reproduction Science* 149 (3-4): 259-65. doi:10.1016/j.anireprosci.2014.06.032.
- Sieme, H., Echte, A., Klug, E., 2002, «Effect of frequency and interval of semen collection on seminal parameters and fertility of stallions». *Theriogenology* 58, 313-316.
- Sieme, H., Harrison, R. A. P., & Petrunkina, A. M. (2008). «Cryobiological determinants of frozen semen quality, with special reference to stallion». *Animal reproduction science*, 107(3), 276-292.

- Siffroi, J P, y J P Dadoune. 2001. «Accumulation of transcripts in the mature human sperm nucleus: implication of the haploid genome in a functional role». *Italian Journal of Anatomy and Embryology = Archivio Italiano Di Anatomia Ed Embriologia* 106 (2 Suppl 2): 189-197.
- Singh, N P, M T McCoy, R R Tice, y E L Schneider. 1988. «A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells». *Experimental Cell Research* 175 (1): 184-91.
- Smits, Katrien, Karen Goossens, Ann Van Soom, Jan Govaere, Maarten Hoogewijs, Emilie Vanhaesebrouck, Cesare Galli, Silvia Colleoni, Jo Vandesompele, y Luc Peelman. 2009. «Selection of reference genes for quantitative real-time PCR in equine in vivo and fresh and frozen-thawed in vitro blastocysts». *BMC Research Notes* 2: 246. doi:10.1186/1756-0500-2-246.
- Steilmann, Cornelia, Márcia C O Cavalcanti, Marek Bartkuhn, Jörn Pons-Kühnemann, Hans-Christian Schuppe, Wolfgang Weidner, Klaus Steger, y Agnieszka Paradowska. 2010. «The interaction of modified histones with the bromodomain testis-specific (BRDT) gene and its mRNA level in sperm of fertile donors and subfertile men». *Reproduction* 140 (3): 435 -443. doi:10.1530/REP-10-0139.
- Squires EL, BW Pickett, JK Graham, DK Vanderwall, PM McCue y JE Bruemmer. 1999. Biology and structure of spermatozoa and their response to cooling. In: Squires EL, BW Pickett, JK Graham, DK Vanderwall, PM McCue y JE Bruemmer (ed). *Cooled and frozen Stallion Semen*. Colorado State University, Colorado, USA, Pp 3-11.
- Sun, Yuan, Yan Li, Dianzhong Luo, y D. Joshua Liao. 2012. «Pseudogenes as Weaknesses of ACTB (Actb) and GAPDH (Gapdh) Used as Reference Genes in Reverse Transcription and Polymerase Chain Reactions». *PLoS ONE* 7 (8) (agosto 22): e41659. doi:10.1371/journal.pone.0041659.
- Sutovsky, Peter, Yukihiro Terada, y Gerald Schatten. 2001. «Ubiquitin-Based Sperm Assay for the Diagnosis of Male Factor Infertility». *Human Reproduction* 16 (2): 250-58. doi:10.1093/humrep/16.2.250.
- Talbot, P, y R S Chacon. 1981. «A triple-stain technique for evaluating normal acrosome reactions of human sperm». *The Journal of Experimental Zoology* 215 (2): 201-8. doi:10.1002/jez.1402150210.
- Tomlinson, M.J., O. Moffatt, G.C. Manicardi, D. Bizzaro, M. Afnan, y D. Sakkas. 2001. «Interrelationships between seminal parameters and sperm nuclear DNA damage before and after density gradient centrifugation: implications for assisted conception». *Human Reproduction* 16 (10): 2160 -2165. doi:10.1093/humrep/16.10.2160.
- Uwland, J., 1984, «Correlation between the number of inseminated spermatozoa and results of fertilization in dairy cattle». *Verband tussen het aantal geïnsemineerde zaadcellen en de bevruchtingsresultaten bij melkvee*. 109, 405-412.
- Vandesompele, Jo, Katleen De Preter, Filip Pattyn, Bruce Poppe, Nadine Van Roy, Anne De Paepe, y Frank Speleman. 2002. «Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes». *Genome Biology* 3 (7) (junio 18): RESEARCH0034.

- Varner, D D, C R Ward, B T Storey, y R M Kenney. 1987. «Induction and characterization of acrosome reaction in equine spermatozoa». *American Journal of Veterinary Research* 48 (9): 1383-89.
- Varner, D, C Love, S Brinsko, T Blanchard, D Hartman, S Bliss, B Carroll, y M Eslick. 2008. «Semen Processing for the Subfertile Stallion». *Journal of Equine Veterinary Science* 28 (noviembre): 677-685. doi:10.1016/j.jevs.2008.10.012.
- Verstegen, J., M. Iguer-Ouada, y K. Onclin. 2002. «Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice». *Theriogenology* 57 (1) (enero 1): 149-179. doi:10.1016/S0093-691X(01)00664-1.
- Villegas, J, M Schulz, L Soto, y R Sanchez. 2005. «Bacteria induce expression of apoptosis in human spermatozoa». *Apoptosis: An International Journal on Programmed Cell Death* 10 (1) (enero): 105-110. doi:10.1007/s10495-005-6065-8.
- Walker, Nigel J. 2002. «Tech.Sight. A technique whose time has come». *Science (New York, N.Y.)* 296 (5567) (abril 19): 557-559. doi:10.1126/science.296.5567.557.
- Watson, P F. 2000. «The causes of reduced fertility with cryopreserved semen». *Animal Reproduction Science* 60-61 (julio 2): 481-492.
- Welch, J. E., E. C. Schatte, D. A. O'Brien, y E. M. Eddy. 1992. «Expression of a Glyceraldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase Gene Specific to Mouse Spermatogenic Cells.» *Biology of Reproduction* 46 (5): 869-78. doi:10.1095/biolreprod46.5.869.
- Wilhelm, K M, J K Graham, y E L Squires. 1996. «Comparison of the fertility of cryopreserved stallion spermatozoa with sperm motion analyses, flow cytometric evaluation, and zona-free hamster oocyte penetration». *Theriogenology* 46 (4): 559-78. doi:10.1016/0093-691X(96)00209-9.
- Williams, Andrew C., y W. Christopher L. Ford. 2001. «The Role of Glucose in Supporting Motility and Capacitation in Human Spermatozoa». *Journal of Andrology* 22 (4): 680-95. doi:10.1002/j.1939-4640.2001.tb02229.x.
- Wirta, Valtteri. 2006. *Mining the transcriptome - methods and applications*. Stockholm: School of Biotechnology Royal Institute of Technology.
- Wrench, N, C R F Pinto, G R Klinefelter, D J Dix, W L Flowers, y C E Farin. 2010. «Effect of season on fresh and cryopreserved stallion semen». *Animal Reproduction Science* 119 (3-4) (junio): 219-227. doi:10.1016/j.anireprosci.2010.02.007.
- Zeng, Changjun, Lian He, Wenpei Peng, Li Ding, Keyi Tang, Donghui Fang, y Yan Zhang. 2014. «Selection of optimal reference genes for quantitative RT-PCR studies of boar spermatozoa cryopreservation». *Cryobiology* 68 (1): 113-21. doi:10.1016/j.cryobiol.2014.01.004.
- Zhang, Yuwen W, Elizabeth G Davis, y Jianfa Bai. 2009. «Determination of internal control for gene expression studies in equine tissues and cell culture using quantitative RT-PCR». *Veterinary Immunology and Immunopathology* 130 (1-2) (julio 15): 114-119. doi:10.1016/j.vetimm.2009.01.012.

Zini, A, R Bielecki, D Phang, y M T Zenzes. 2001. «Correlations between two markers of sperm DNA integrity, DNA denaturation and DNA fragmentation, in fertile and infertile men». *Fertility and Sterility* 75 (4): 674-77.

Anexo



Determining ACTB, ATP5B and RPL32 as optimal reference genes for quantitative RT-PCR studies of cryopreserved stallion semen



A. Pérez-Rico^a, F. Crespo^b, M.L. Sanmartín^a, A. De Santiago^c, J.L. Vega-Pla^{a,*}

^a Laboratorio de Investigación Aplicada, Cría Caballar de las Fuerzas Armadas (Ministry of Defense), Apdo. de Correos 2087, 14080 Córdoba, Spain

^b Centro Militar de Cría Caballar de Ávila, Cría Caballar de las Fuerzas Armadas (Ministry of Defense), Acuartelamiento “El Pradillo”, Calle Arsenio Gutierrez Palacios s/n, 05005 Ávila, Spain

^c Centro Militar de Cría Caballar de Écija, Cría Caballar de las Fuerzas Armadas (Ministry of Defense), Calle Nueva 2, 41400 Écija, Sevilla, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 18 November 2013

Received in revised form 12 May 2014

Accepted 20 August 2014

Available online 28 August 2014

Keywords:

Stallion

Houskeeping gene

Cryopreserved sperm

Quantitative polymerase chain reaction

ABSTRACT

Equine germplasm bank management involves not only the conservation and use of semen doses, in addition it can also be a resource to study stallion semen quality and after thawing semen properties for reproductive purposes. A possible criterion to measure quality may be based on differential gene expression of loci involved during spermatogenesis and sperm quality maturation. The rapid degradation of sperm after thawing affects the integrity and availability of RNA. In this study we have analyzed genes expressed in equine cryopreserved sperm, which provided an adequate amplification, specificity, and stability to be used as future reference genes in expression studies. Live spermatozoa were selected from cryopreserved semen straws derived from 20 stallions, through a discontinuous concentration gradient. RNA purification followed a combination of the organic and column extraction methods together with a deoxyribonuclease treatment. The selective amplification of nine candidate genes was undertaken using reverse transcription and real-time polymerase chain reaction (qPCR) carried out in a one-step mode (qRT-PCR). Specificities were tested by melting curves, agarose gel electrophoresis and sequencing. In addition, gene stabilities were also calculated. Results indicated that five out of the nine candidate genes amplified properly (*β-Actin*, *ATP synthase subunit beta*, *Protamine 1*, *L32 ribosomal protein* and *Ubiquitin B*), of which *β-Actin* and the *L32 Ribosomal protein* showed the highest stability thus being the most suitable to be considered as reference genes for equine cryopreserved sperm studies, followed by the *ATP synthase subunit beta* and *Ubiquitin B*.

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The primary goal of horse semen evaluation consists not only of assessing ejaculate quality; it also has an ultimate objective of checking the potential stallion fertility.

In laboratory sperm quality evaluation typically includes assessment of the integrity of genomic DNA (gDNA), acrosome, plasma membrane and mitochondria, as well as sperm–oocyte interactions (Bissonnette et al., 2009; Crespo et al., 2013; Ferrusola et al., 2009; Rodríguez-Martínez and Vega, 2013). Nonetheless, equine semen comprises significant limitations for artificial insemination use. A single ejaculate provides very few doses, freezing of semen is complex and endurance dependent on each stallion, in

* Corresponding author. Tel.: +34 957322344; fax: +34 957329324.
E-mail address: jvegpla@gmail.com (J.L. Vega-Pla).

addition cryopreserved sperm survival is seriously reduced after thawing. As a result of cryopreservation, premature capacitation and acrosome reaction of spermatozoa, damage membranes and kill cells has been described in stallion spermatozoa (Gallardo Bolaños et al., 2012; Katila, 2001; Ortega-Ferrusola et al., 2009). Moreover, the integrity and availability of RNA is also affected by the quick degradation of sperm after thawing.

The heterogeneous RNA content of a spermatozoon could in principle be used as a pattern for the genomic analysis of semen quality, both in terms of spermatogenesis and fertility potential (Bissonnette et al., 2009; Das et al., 2013; Govindaraju et al., 2012; Krawetz et al., 2011). Sperm RNAs are viewed as candidate elements for a successful reproduction to take place; any testicular perturbation which alters the production of sperm consequently reduces fertility, therefore also modifies the sperm RNA fingerprint from that of the normal situation (Ostermeier et al., 2002).

RNA isolation from sperm cells still presents several difficulties, in order to ensure that only RNA from germinal cells is available for extraction it is necessary to eliminate all of the somatic cells as well as the immature diploid spermatozoa from the ejaculates. There also exists differences among species with regard to sperm attributes and chromatin packaging; therefore, protocols for RNA isolation require species-specific adjustments and a particular optimization.

The suitability of a particular reference gene thus rests on the specific research system and the inherent experimental conditions (Bustin, 2000). Increasing concerns regarding the normalization by means of ideal reference genes have led to the development of different mathematical algorithms aimed at assessing the stability of reference genes. In the year 2002 the software package GeNorm (Vandesompele et al., 2002) was developed which addresses critical issues of reference gene validation and ranks candidate reference genes according to their expression stability using raw, non-normalized expression levels. A similar software package named BestKeeper (Pfaffl et al., 2002) was developed which takes into account the quantification cycle values (C_q) of candidate reference genes instead of their relative quantities. This last software package employs a statistical algorithm which estimates the Pearson correlation coefficient of each candidate reference gene pair along with the pair's correlation significance probability. Furthermore, the software package NormFinder (Andersen et al., 2004) uses a model-based evaluation strategy which ranks candidate genes according to minimal inter and intra-group variations. With respect to the output of all three software packages, the top ranked reference genes are further recommended for use as endogenous controls in similar experimental systems. Overall, the use of different software packages aids to ensure the robustness of the selected reference genes (Mehta et al., 2010). Zeng et al. (2014) used these three different statistical algorithms to analyze 11 potential reference genes in boar spermatozoa samples frozen with different cryoprotectants.

In the present study, software packages *GeNorm*, *NormFinder* and *BestKeeper* were made use of to validate the different candidate reference genes appropriate for

the qRT-PCR profiling experiments carried out with cryopreserved semen straw samples derived from horses of different breeds and with different sperm motilities.

2. Materials and methods

2.1. Purified spermatozoa collection

Frozen sperm straws derived from 20 stallions (one per stallion) with an apparently normal fertility were randomly selected from the Army Equine Breeding Germplasm Bank (see Supplementary Table S1). Progressive motility (%) was calculated by means of the computerized analysis system ISAS. Thereafter, semen samples were divided into two groups according to their progressive motility percentage (poor < 25%; good > 25%).

2.2. Sperm purification and quantification

All sperm samples were exposed to a discontinuous centrifugation gradient through a 40% silanized silica particle solution EquiPure™ Top Layer (Nidacon International, Mölndal, Sweden), in order to separate the mature spermatozoa from other somatic cells and immature diploid spermatozoa (Das et al., 2010; Varner et al., 2008). A raw semen sample (500 μ l) containing no more than 500×10^6 spermatozoa was gently layered over the top 1.5 ml EquiPure™ layer and centrifuged at 10,000 g during 15 s. Centrifugation at this gradient separated samples into two distinct layers: spermatozoa concentrated at the bottom whereas all other cell types remained above of the gradient solution. Spermatozoa pellets were washed twice using 1 ml of phosphate buffered saline (PBS) solution and re-suspended in 50 μ l of PBS. Purified 10 μ l spermatozoa aliquots diluted with formamide were placed in a Neubauer Counting Chamber (Hausser Scientific, Horsham PA, USA) and observed under a light microscope (400 \times) to calculate the final spermatozoa concentration. Samples were diluted with RNase-free water up to a concentration of 0.5×10^6 spermatozoa/ μ l to be used for immediate RNA extraction.

2.3. RNA extraction

Total RNA was extracted from purified spermatozoa (50 μ l) using the Direct-zol™ RNA MiniPrep kit (Zymo Research, Irvine, USA) and exposed to an on-column DNase I digestion during the extraction process. A second digestion after extraction was undertaken using DNase I Amplification Grade (Sigma Aldrich, Lyon, France). RNA was eluted to a final volume of 100 μ L with RNase-free water. RNA recovery rate was quantified using a Nanodrop spectrophotometer (Nanodrop Technologies, Wilmington, DE, USA). RNA samples were deep frozen in liquid nitrogen.

2.4. Selection of reference genes and primer design

Nine potential reference genes were selected (Table 1), special attention was paid to select genes whose proteins belong to different functional classes, which in theory should reduce the chance of gene co-regulation.

Table 1
Reference candidate genes.

Gene name	Gene symbol	Amplicon bp	Primers 5' → 3'	GeneBank access number
<i>β-actin</i>	<i>ACTB</i>	88	CCAGCACGATGAAGATCAAG GTGGACAATGAGGCCAGAAT	AF035774
<i>ATP synthase subunit beta</i>	<i>ATP5B</i>	168	TGGGGTGCAAAGATCCTAC GAGTGTGTCACAGGCCATTT	NM.001195525
<i>Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase</i>	<i>GAPDH</i>	106	GGTGAAGGTCGGAGTAAACG AATGAAGGGATCATTGATGG	AF083897
<i>Histone H2A type 1</i>	<i>H2AI</i>	105	ATATTCAGGCCGTGCTGCT TTTGGGTTTCAAAGCGTTTC	XM.001497311.2
<i>Heat shock protein 90</i>	<i>HSP90</i>	185	AGCAAGGCCAAGTTTGAGAA ATTGTGGAGTTGTCCCAGAG	HQ890170
<i>Protamine 1</i>	<i>PRM1</i>	125	AGCCAGAGCCAGAGCAGAT CGTCTTCTCTACACCTCAGGA	L10654
<i>L32 ribosomal protein</i>	<i>RPL32</i>	181	GGAACCCAGAGGCATTGAC CAGTACGATTTGTGCACATG	XM.001501497.3
<i>Succinate dehydrogenase complex, subunit A</i>	<i>SDHA</i>	159	TCCATCGCATAAGAGCAAAG GGTGGAACTGAACGAACCTCC	DQ402987.1
<i>Ubiquitin B</i>	<i>UBQ</i>	166	GAACGTCAAGGCCAAGATCC AAATCTGCATACCRCTCTC	NM.001081862.1

Primers were obtained from published sequences of *β-actin* (*ACTB*) (Smits et al., 2009) and *Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase* (*GAPDH*) (Beekman et al., 2011). DNA and cDNA sequences for the remaining genes were identified using the NCBI *Equus caballus* (horse) Genome Resources (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/genome/guide/horse/>). The *ATP synthase subunit beta* (*ATP5B*), *Heat shock protein 90* (*HSP90*), *Protamine 1* (*PRM1*) and *Succinate dehydrogenase complex subunit A* (*SDHA*) primer pairs were designed using the *Primer3 Plus* software (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>). The *L32 ribosomal protein* (*RPL32*) and *Ubiquitin B* (*UBQ*) DNA and cDNA sequences were imported into the *PerlPrimer v1.1.17* software package (Marshall, 2004) in order to design the intron-spanning mRNA specific primers. The sequence-specificity of primers pairs was confirmed using the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) against the NCBI *Equus caballus* (horse) Genome Resources.

2.5. RT-qPCR and primer validation

RT-qPCR was carried out using the One-Step RT-PCR PreMix Kit (Intron biotechnology, Kyungki-Do, Korea), total reaction volume comprised 20 µl containing 30–40 ng of RNA, 0.6 µM primers and 2% EvaGreen Dye (Biotium Inc, Hayward, USA). A non template control was used in all qPCR. The quality of the PCR products was evaluated in basis of the early *Cq* score during the qPCR run considering a clean single melting curve peak. Amplicons obtained from each primer pair were visualized in 2% agarose gels after electrophoresis using as a molecular marker the PCR Marker[®] (CentiMark PCR Marker, Vivantis, Selangor Darul Ehsan, Malaysia). In addition, genomic DNA was tested by means of *β-actin* amplification as this gene amplifies genomic DNA with a 219 bp fragment and also a possible pseudogen of 88 bp (Sun et al., 2012), while cDNA is only amplified yielding a 88 pb fragment (see Supplementary Fig. S1). Moreover, products were also sequenced using their respective forward and reverse primers and specificity was validated comparing the sequences retrieved

with those contained by the NCBI *Equus caballus* (horse) Genome Resources.

2.6. Reference gene stability and gene expression normalization

Sample-by-sample real-time PCR efficiencies and raw quantification cycles (*Cq*) were determined using the *Comparative quantification* module part of the Rotor-Gene[™] 6000 software package (Corbett Research, Mortlake, Australia). In order to compare the transcription levels of selected genes across different samples, relative concentrations of each sample were calculated based on the raw *Cq* values and the efficiencies of each particular reaction, using as a calibration standard the sample with the lowest value. Relative concentrations were subsequently used for a further analysis carried out with the *geNorm* and the *NormFinder* software programs. With regard to the normalization calculations, while *geNorm* opts for two genes displaying low intra-group and approximately the same non-vanishing inter-group variation, *NormFinder* takes into account two genes with a minimal combined intra- and inter-group expression variation. Sperm motility is considered to be one of the key features of semen analysis and usually there are differences among stallions. Two groups of individuals based on the percentage of progressive motility after thawing were selected (Supplementary Table S1). Group 1 had motility values above 25%, whereas the group 2 motility values were lower than 25%. In addition, the raw *Cq* values of each reaction were also used for an analysis undertaken with the *BestKeeper* software package.

3. Results

3.1. RNA extraction, amount recovered and quality of RNA samples

Total extracted RNA yields ranged from 10 to 26 ng/µl. RT-qPCR assays were successful except for *HSP90* and *SDHA* which showed late *Cq* values and in addition some samples did not amplify. Melting curve analysis gave rise

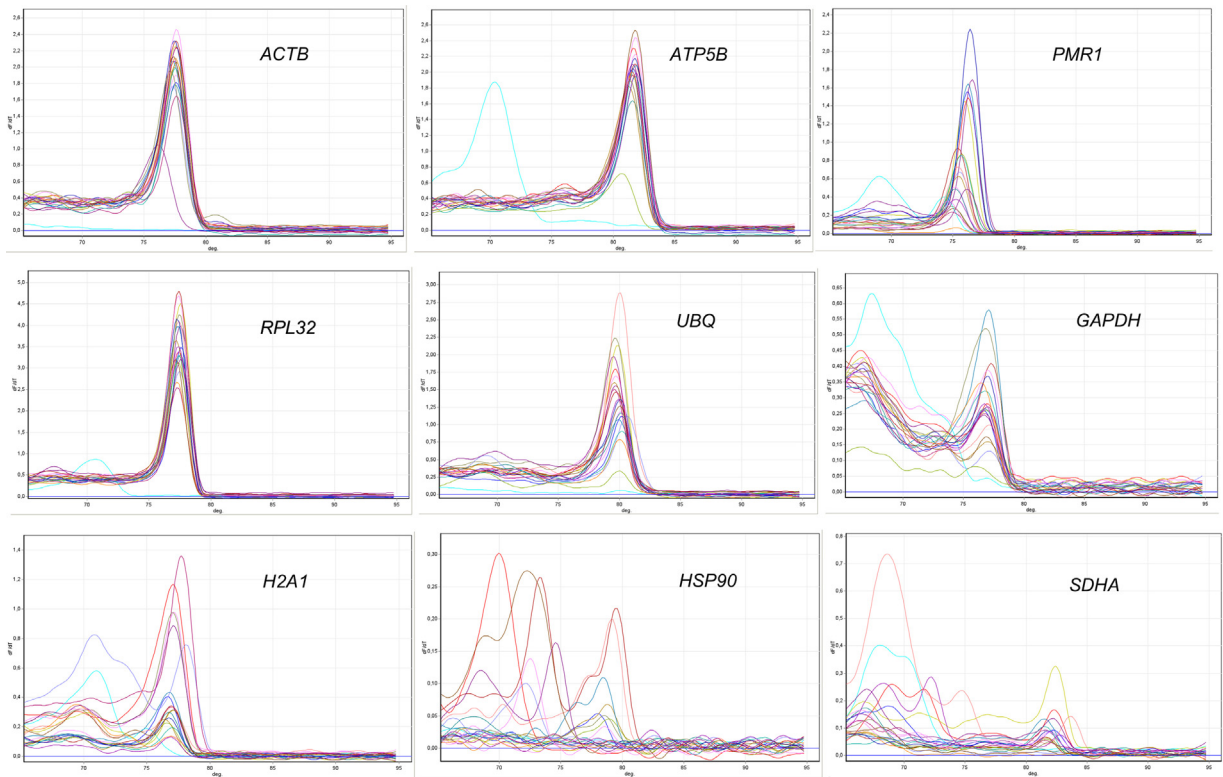


Fig. 1. Melting curves of the nine reference genes tested in equine cryopreserved sperm samples. Dotted lines correspond to non template sample.

to clean single product peak/dissociation temperatures for the *ACTB*, *ATP5B*, *RPL32*, *PMR1* and *UBQ* genes; in contrast to the *GAPDH*, *H2A1*, *HSP90* and *SDHA* genes which yielded multiple peaks (Fig. 1). No amplifications were observed for the non template controls. The expected size of the PCR products of each primer pair were visualized by means of 2% agarose gel electrophoresis, however, *GAPDH*, *H2A1*, *HSP90* and *SDHA* also showed a smear band. Genomic DNA contamination was excluded as only one 88 bp fragment of β -actin was amplified, although some traces of the 219 bp genomic DNA could be observed in the melting curves. DNA sequencing confirmed that the expected bands of the PCR products were specific for the target genes of interest. Candidate gene amplification efficiency results of all RT-qPCR reactions were found to be suitable with the exception of *HSP90* which displayed very low values, in addition, the standard errors of *GAPDH*, *HSP90*, *SDHA* and *H2A1* were higher than 0.1 (Table 2).

Table 2

Average candidate gene qPCR efficiency values and their standard errors (SD), followed by the geNorm average expression stability values (*M*), the NormFinder stability values and the BestKeeper coefficients of variation (CV%) together with their standard deviations (SD).

Gene	qPCR efficiency (SD)	GeNorm <i>M</i> value	NormFinder stability	BestKeeper CV% (SD)
<i>ACTB</i>	1.71 (0.05)	0.880	0.090	2.34 (0.67)
<i>ATP5B</i>	1.73 (0.06)	1.019	0.170	2.54 (0.79)
<i>GAPDH</i>	1.55 (0.30)	–	–	–
<i>H2A1</i>	1.74 (0.12)	–	–	–
<i>HSP90</i>	0.96 (0.84)	–	–	–
<i>PRM1</i>	1.67 (0.02)	1.325	0.250	5.21 (1.07)
<i>RPL32is</i>	1.68 (0.03)	0.868	0.093	3.17 (0.97)
<i>SDHA</i>	1.59 (0.52)	–	–	–
<i>UBQis</i>	1.61 (0.04)	1.112	0.180	4.44 (1.34)

3.2. Reference gene expression stabilities

Due to the amplification and efficiency problems of *GAPDH*, *HSP90*, *SDHA* and *H2A1*, their gene expression stabilities were not investigated. The average expression stability *M* of the candidate genes tested was calculated by means of the software package *geNorm*. The *M* value is defined as the average pairwise variation of a particular gene with all other reference genes within a given group of cDNA samples. The gene displaying the lowest *M* value is considered to have the most stable expression, while the gene with the highest *M* value exhibits the least stable expression. As can be observed in Table 2, the *M* values of *RPL32*, *ACTB* and *ATP5B* ranked lowest. The respective individual *M* values compared to the other candidate genes are represented in Fig. 2.

Additionally, data was also evaluated with the *NormFinder* algorithm. The two group analysis of the

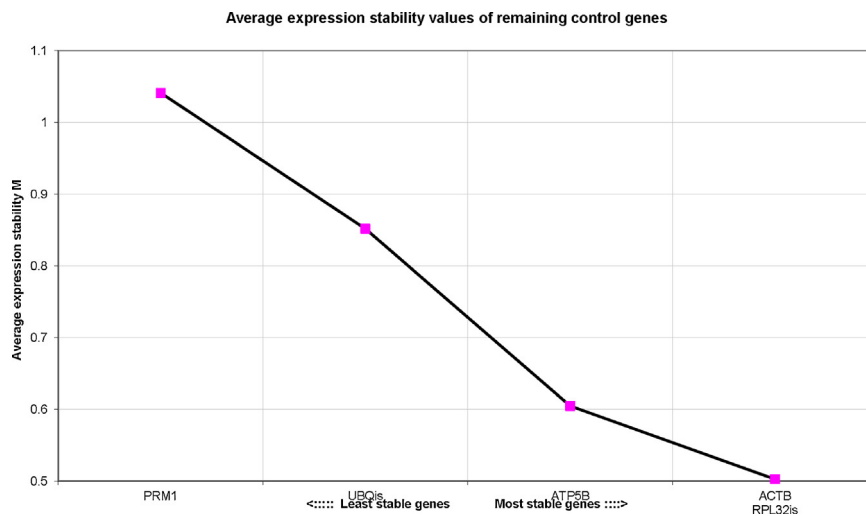


Fig. 2. Gene expression stability M values of the candidate reference genes observed in equine cryopreserved sperm as calculated by the *GeNorm* software package.

Table 3
Intra- and intergroup stabilities.

Gen/group	Intra-group		Inter-group	
	1	2	1	2
<i>ACTB</i>	0.099	0.066	0.006	-0.006
<i>ATP5B</i>	0.316	0.262	0.038	-0.038
<i>PRM1</i>	0.913	0.401	-0.076	0.076
<i>RPL32</i>	0.105	0.069	-0.005	0.005
<i>UBQ</i>	0.420	0.245	0.037	-0.037

candidate reference gene expression estimated *RPL32* and *ACTB* to hold the lowest stability values (Table 2) displaying the lowest intra- and inter-group variations followed by *ATP5B* (Table 3).

The analysis carried out by *BestKeeper* of the raw Cq values derived from 20 samples calculated the coefficient of variation (% Cq) and the standard deviation ($\pm Cq$) of the five candidate reference genes (Table 2). All of the candidate reference genes under study exhibited a standard deviation value lower than 1 with the exception of *PMR1* and *UBQ* (both considered unacceptable). The analysis of the remaining three genes (*ACTB*, *ATP5B* and *RPL32*) showed significant correlations ($p < 0.001$) between their expression levels and the *BestKeeper* indexes (0.903, 0.887 and 0.962, respectively). These results coincided with those obtained through the *geNorm* and *NormFinder* computer programs, although the three software tools are based on different statistical algorithms.

4. Discussion

To eliminate sources of non-biological variation, qRT-PCR gene expression analysis requires stringent normalization strategies. RNA extraction confers considerable variation according to different tissues and experimental conditions. Furthermore, the use of improper reference genes is also known to lead to erroneous results. The

present study suggests that an organic RNA extraction followed by a column purification is successful in the case of cryopreserved equine doses of semen; nonetheless, despite having incorporated into the extraction protocol a column *DNase I* treatment, RNA samples had residual amounts of DNA, therefore, it was necessary to undertake an additional *DNase I* treatment after extraction. This situation may arise due to the special equine sperm chromatin packaging situation which hinders the complete removal of residual DNA. For equine semen Das et al. (2010) compared two different RNA isolation methods based on fresh, frozen and extended ejaculates without cryoprotectants, finally recommending the organic extraction method even though the results obtained from the frozen samples were not satisfactory. The main difference of the previous study with the current methodology is that we have used samples derived from a germoplasm bank containing cryoprotectants to preserve viable sperm in liquid nitrogen. Several authors have chosen a hot organic extraction (60 °C for 30 min) for frozen bull semen (Lalancette et al., 2008). However, Bissonnette et al. (2009) published a study regarding mRNA expression profiles of bull sperm with different motility degrees; they compared several cold and hot organic extraction protocols finding no significant differences among the cold organic extraction methods while different results were obtained depending on the hot organic protocol used. They also recognized that they recovered very small amounts of RNA having to resort to an amplification step before being able to reverse transcribe in studies contemplating many genes. Other authors have successfully used the RNA extraction column protocol with frozen bovine semen (Li et al., 2011).

Our present equine sperm RNA extraction yields agree with the previous human sperm values of 10–20 ng/ μ l obtained by Avendaño et al. (2009). Wrench et al. (2010) compared the gene expression levels of fresh and cryopreserved stallion semen collected during different seasons. These authors detected no differences between fresh and frozen sperm samples, nonetheless, affirmed that the

organic extraction technique did not offer the same yield as for human semen having recovered 25 times less using stallion semen. This minimal yield coincides with the low amount of RNA recovered in the present study, implying that a species factor is critical to develop an efficient RNA extraction technique.

In this study genes *GAPDH*, *H2AI*, *HSP90*, *SDHA* were excluded although some of them have been used systematically as reference genes (Carreau et al., 2009; Cavalcanti et al., 2011; Steilmann et al., 2010). In horses, so far there exist few studies with regard to gene expression of cryopreserved stallion semen, Wrench et al. (2010) used *GAPDH* to demonstrate the absence of the *SP22 protein* mRNA, although in this case it was not a differential expression study. Gene *HSP90* was used as a reference gene of human semen studies (Cavalcanti et al., 2011; Steilmann et al., 2010), these studies have shown that *HSP90* is not suitable to be used as a reference gene due to amplification problems and a low efficiency. Gene *SDHA* has also comprised amplification problems and displayed a low efficiency, although it has been used as a reference gene in studies with different horse tissues (Beekman et al., 2011; Cappelli et al., 2008; Smits et al., 2009). Gene *H2AI* has been used as a reference gene for equine blastocysts (Smits et al., 2009), exhibiting a good amplification yet the melting curve revealed amplification of different amplicons, in addition, the efficiency standard error was higher than 0.1. Gene *GAPDH* has extensively been used in gene expression studies (fresh human semen – (Cavalcanti et al., 2011; Steilmann et al., 2010)/bovine semen – (Bissonnette et al., 2009)/horse cryopreserved semen – (Wrench et al., 2010) and equine testicular tissue – (Herrera-Luna et al., 2012), although it seems to be amplified properly it should be discarded due to its poor efficiency. However, Sun et al. (2012) detected amplification problems for gene *GAPDH*.

Several methods have been proposed to allow for an accurate normalization of gene expression using qRT-PCR (Andersen et al., 2004; Pfaffl et al., 2002; Vandesompele et al., 2002), nevertheless, at present there exists no consensus as to which algorithm should be used in order to measure reference gene stability. A comparison of different methods for reference gene selection allows for a better identification of the most reliable controls, while at the same time it reduces the risk of artificial selection of co-regulated transcripts (Mehta et al., 2010).

Reference gene validation presents a circular problem: assessing the stability of expression of a given gene cannot be achieved without using another gene as a reference guide. Several algorithms have been proposed. The *GeNorm* software package (Vandesompele et al., 2002) is one of the most popular algorithms in order to validate candidate reference genes displaying low variability levels. *GeNorm* analysis is independent of between sample starting material amount variations. In the present case, according to the analysis undertaken with *GeNorm* *RPL32*, *ACTB* and *ATP5B* represented the best combination of reference genes for cryopreserved equine semen studies.

Reference genes, in addition to their basic functions, also exert pleiotropic effects on other cellular systems, thus decreasing the value of the function-based predictions of co-regulation. To overcome this problem Andersen et al.

(2004) proposed a model based approach which has been incorporated into the software package *NormFinder*. This algorithm ranks candidate reference genes according to the least estimated intra and inter group variation, which in addition also serves as an effective method to overcome the influence of co-regulation. Sperm motility is a convenient measurement of relative cell health and the most commonly used indicator of semen quality. Reference genes must be stable in stallions with different progressive motility. In this case genes *RPL32*, *ACTB* and *ATP5B* also obtained the highest scores as reference genes. Nevertheless the *NormFinder* analysis identified *GAPDH* as the reference gene with the highest expression stability in a previous study of boar semen cryopreserved (Zeng et al., 2014).

In order to compare the output results of *GeNorm* and *NormFinder* with an independent ranking method, the data was in addition also analyzed with the *BestKeeper* software tool (Pfaffl et al., 2002). In the approach pursued by *BestKeeper*, ideal reference genes are expected to have a stable expression, as indicated by a low variation in the tissue under consideration. Stability and the *BestKeeper* index relationship (correlation and *p* values) are the two most important criteria to evaluate the stability of reference genes. This algorithm uses a pair-wise correlation analysis of all candidate genes based on the raw Cq values and calculates the geometric mean of the most suited reference genes. Again, in the case of the *BestKeeper* analysis, the three most appropriate reference genes consisted of *ACTB*, *ATP5B* and *RPL32*.

The *PRM1* gene could have been considered as a candidate reference gene, in fact it has already been used in a bovine spermatozoa study (Bissonnette et al., 2009), then again it displayed a SD value higher than 1 provided by the *BestKeeper* analysis. This gene is involved in the packaging of chromatin during the development of spermatozoa, being a protein whose equilibrium with *protamine 2* holds importance with regard to fertility (García-Peiró et al., 2011), consequently expression of *PRM1* could be affected by different circumstances during spermatogenesis. In the same manner, *UBQ* which has been used as a classical reference gene (Carreau et al., 2009; Cavalcanti et al., 2011; Steilmann et al., 2010), was discarded by *BestKeeper* due to a high SD value.

5. Conclusions

The RT-PCR results together with the *geNorm*, *NormFinder* and *BestKeeper* analysis of the β -Actin, *ATP synthase subunit beta* and *L32 ribosomal protein* genes of the present study suggest that they could be selected as first choice reference genes in equine cryopreserved semen studies. In addition, the *Protamine 1* and *Ubiquitin B* genes could also be used as reference genes although we advise cautious use, in contrast, *Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*, *Histone H2A type 1*, *Heat shock protein 90* and *Succinate dehydrogenase complex subunit A* should be avoided as reference genes in further studies. The results of the present research will benefit future studies on gene expression of loci related with semen quality and fertility of stallions together with semen cryopreservation suitability.

Conflict of interest

All authors acknowledged that there is no financial and/or personal relationships with other people or organizations.

Authors' contributions

Pérez-Rico carried out the qRT-PCR studies and drafted the manuscript. Vega-Pla designed or extracted primers from previous publications for qRT-PCR and provided daily supervision for Pérez-Rico, a PhD student in training. De Santiago and Crespo collected the stallion ejaculates and cryopreserved the sperm. Sanmartin participated to improve the manuscript. Vega-Pla conceived the study, participated in its design, coordinated all efforts and finalized the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

This work was entirely supported by Cría Caballar de las Fuerzas Armadas (Ministry of Defense) and has been performed as part of the collaborative effort between the Cría Caballar de las Fuerzas Armadas and the Diputación de Córdoba.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.anireprosci.2014.08.007>.

References

- Andersen, C.L., Jensen, J.L., Ørntoft, T.F., 2004. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Res.* 64, 5245–5250, <http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-0496>.
- Avendaño, C., Franchi, A., Jones, E., Oehninger, S., 2009. Pregnancy-specific β -1-glycoprotein 1 and human leukocyte antigen-E mRNA in human sperm: differential expression in fertile and infertile men and evidence of a possible functional role during early development. *Hum. Reprod.* 24, 270–277, <http://dx.doi.org/10.1093/humrep/den381>.
- Beekman, L., Tohver, T., Dardari, R., Léguillette, R., 2011. Evaluation of suitable reference genes for gene expression studies in bronchoalveolar lavage cells from horses with inflammatory airway disease. *BMC Mol. Biol.* 12, 5, <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2199-12-5>.
- Bissonnette, N., Lévesque-Sergerie, J.-P., Thibault, C., Boissonneault, G., 2009. Spermatozoal transcriptome profiling for bull sperm motility: a potential tool to evaluate semen quality. *Reproduction* 138, 65–80, <http://dx.doi.org/10.1530/REP-08-0503>.
- Bustin, S.A., 2000. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J. Mol. Endocrinol.* 25, 169–193.
- Cappelli, K., Felicetti, M., Capomaccio, S., Spinsanti, G., Silvestrelli, M., Supplizi, A.V., 2008. Exercise induced stress in horses: selection of the most stable reference genes for quantitative RT-PCR normalization. *BMC Mol. Biol.* 9, 49, <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2199-9-49>.
- Carreau, S., Delalande, C., Galeraud-Denis, I., 2009. Mammalian sperm quality and aromatase expression. *Microsc. Res. Tech.* 72, 552–557, <http://dx.doi.org/10.1002/jemt.20703>.
- Cavalcanti, M.C.O., Failling, K., Schuppe, H.C., Bergmann, M., Stalf, T., Weidner, W., Steger, K., 2011. Validation of reference genes in human testis and ejaculate. *Andrologia* 43, 361–367, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1439-0272.2010.01076.x>.
- Crespo, F., Gosálvez, J., Gutiérrez-Cepeda, L., Serres, C., Johnston, S., 2013. Colloidal centrifugation of stallion semen results in a reduced rate of sperm DNA fragmentation. *Reprod. Domest. Anim.* 48, e23–e25, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1439-0531.2012.02140.x>.
- 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., 2013. Stallion sperm transcriptome comprises functionally coherent coding and regulatory RNAs as revealed by microarray analysis and RNA-seq. *PLoS ONE* 8, e56535, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0056535>.
- Das, P.J., Paria, N., Gustafson-Seabury, A., Vishnoi, M., Chaki, S.P., Love, C.C., Varner, D.D., Chowdhary, B.P., Raudsepp, T., 2010. Total RNA isolation from stallion sperm and testis biopsies. *Theriogenology* 74, 1099–1106, <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.04.023>, 1106e1–2.
- Ferrusola, C.O., Fernández, L.G., García, B.M., Salazar-Sandoval, C., Rodríguez, A.M., Martínez, H.R., Tapia, J.A., Peña, F.J., 2009. Effect of cryopreservation on nitric oxide production by stallion spermatozoa. *Biol. Reprod.* 81, 1106–1111, <http://dx.doi.org/10.1095/biolreprod.109.078220>.
- Gallardo Bolaños, J.M., Miró Morán, Á., Balao da Silva, C.M., Morillo Rodríguez, A., Plaza Dávila, M., Aparicio, I.M., Tapia, J.A., Ferrusola, C.O., Peña, F.J., 2012. Autophagy and apoptosis have a role in the survival or death of stallion spermatozoa during conservation in refrigeration. *PLoS ONE* 7, e30688, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0030688>.
- García-Peiró, A., Martínez-Heredia, J., Oliver-Bonet, M., Abad, C., Amengual, M.J., Navarro, J., Jones, C., Coward, K., Gosálvez, J., Benet, J., 2011. Protamine 1 to protamine 2 ratio correlates with dynamic aspects of DNA fragmentation in human sperm. *Fertil. Steril.* 95, 105–109, <http://dx.doi.org/10.1016/j.fertnstert.2010.06.053>.
- Govindaraju, A., Uzun, A., Robertson, L., Atli, M.O., Kaya, A., Topper, E., Crate, E.A., Padbury, J., Perkins, A., Memili, E., 2012. Dynamics of microRNAs in bull spermatozoa. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 10, 82, <http://dx.doi.org/10.1186/1477-7827-10-82>.
- Herrera-Luna, C.V., Budik, S., Aurich, C., 2012. Gene expression of ACTH, glucocorticoid receptors, 11 β HSD enzymes, LH-, FSH-, GH receptors and aromatase in equine epididymal and testicular tissue. *Reprod. Domest. Anim. Zuchtthg.* 47, 928–935, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1439-0531.2012.01993.x>.
- Katila, T., 2001. In vitro evaluation of frozen-thawed stallion semen: a review. *Acta Vet. Scand.* 42, 199, <http://dx.doi.org/10.1186/1751-0147-42-199>.
- Krawetz, S.A., Kruger, A., Lalancette, C., Tagett, R., Anton, E., Draghici, S., Diamond, M.P., 2011. A survey of small RNAs in human sperm. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* 26, 3401–3412, <http://dx.doi.org/10.1093/humrep/der329>.
- Lalancette, C., Miller, D., Li, Y., Krawetz, S.A., 2008. Paternal contributions: new functional insights for spermatozoal RNA. *J. Cell. Biochem.* 104, 1570–1579, <http://dx.doi.org/10.1002/jcb.21756>.
- Li, C., Sun, Y., Yi, K., Li, C., Zhu, X., Chen, L., Zhou, X., 2011. Detection of the SRY transcript and protein in bovine ejaculated spermatozoa. *Asian-Australas. J. Anim. Sci.* 24, 1358–1364.
- Marshall, O.J., 2004. PerlPrimer: cross-platform, graphical primer design for standard, bisulphite and real-time PCR. *Bioinforma. Oxf. Engl.* 20, 2471–2472, <http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/bth254>.
- Mehta, R., Biredinc, A., Hossain, N., Afendy, A., Chandhoke, V., Younossi, Z., Baranova, A., 2010. Validation of endogenous reference genes for qRT-PCR analysis of human visceral adipose samples. *BMC Mol. Biol.* 11, 39, <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2199-11-39>.
- Ortega-Ferrusola, C., González Fernández, L., Morrell, J.M., Salazar Sandoval, C., Macías García, B., Rodríguez-Martínez, H., Tapia, J.A., Peña, F.J., 2009. Lipid peroxidation, assessed with BODIPY-C11, increases after cryopreservation of stallion spermatozoa, is stallion-dependent and is related to apoptotic-like changes. *Reprod. Camb. Engl.* 138, 55–63, <http://dx.doi.org/10.1530/REP-08-0484>.
- Ostermeier, G.C., Dix, D.J., Miller, D., Khatri, P., Krawetz, S.A., 2002. Spermatozoal RNA profiles of normal fertile men. *Lancet* 360, 772–777, [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(02\)09899-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(02)09899-9).
- Pfaffl, M.W., Horgan, G.W., Dempfle, L., 2002. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res.* 30, e36.
- Rodríguez-Martínez, H., Vega, F.P., 2013. Semen technologies in domestic animal species. *Anim. Front.* 3, 26–33, <http://dx.doi.org/10.2527/af.2013-0030>.
- Smits, K., Goossens, K., Van Soom, A., Govaere, J., Hoogewijs, M., Vanhaesebrouck, E., Galli, C., Colleoni, S., Vandesompele, J., Peelman, L., 2009. Selection of reference genes for quantitative real-time PCR in equine in vivo and fresh and frozen-thawed in vitro blastocysts. *BMC Res. Notes* 2, 246, <http://dx.doi.org/10.1186/1756-0500-2-246>.

- Steilmann, C., Cavalcanti, M.C.O., Bartkuhn, M., Pons-Kuhnemann, J., Schuppe, H.-C., Weidner, W., Steger, K., Paradowska, A., 2010. The interaction of modified histones with the bromodomain testis-specific (BRDT) gene and its mRNA level in sperm of fertile donors and subfertile men. *Reproduction* 140, 435–443, <http://dx.doi.org/10.1530/REP-10-0139>.
- Sun, Y., Li, Y., Luo, D., Liao, D.J., 2012. Pseudogenes as weaknesses of ACTB (Actb) and GAPDH (Gapdh) used as reference genes in reverse transcription and polymerase chain reactions. *PLoS ONE* 7, e41659, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0041659>.
- Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A., Speleman, F., 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* 3, RESEARCH0034.
- Varner, D., Love, C., Brinsko, S., Blanchard, T., Hartman, D., Bliss, S., Carroll, B., Eslick, M., 2008. Semen processing for the subfertile stallion. *J. Equine Vet. Sci.* 28, 677–685, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jevs.2008.10.012>.
- Wrench, N., Pinto, C.R.F., Klinefelter, G.R., Dix, D.J., Flowers, W.L., Farin, C.E., 2010. Effect of season on fresh and cryopreserved stallion semen. *Anim. Reprod. Sci.* 119, 219–227, <http://dx.doi.org/10.1016/j.anireprosci.2010.02.007>.
- Zeng, C., He, L., Peng, W., Ding, L., Tang, K., Fang, D., Zhang, Y., 2014. Selection of optimal reference genes for quantitative RT-PCR studies of boar spermatozoa cryopreservation. *Cryobiology* 68, 113–121, <http://dx.doi.org/10.1016/j.cryobiol.2014.01.004>.