

La identificación de genes candidatos para rasgos de la reproducción en ganado utilizando un enfoque de redes de interacciones funcionales

Francisco Alejandro Paredes-Sánchez ^a

Daniel Trejo-Martínez ^b

Elsa Verónica Herrera-Mayorga ^c

Williams Arellano-Vera ^d

Felipe Rodríguez Almeida ^e

Ana María Sifuentes-Rincón ^{d*}

^a Universidad Autónoma de Tamaulipas. IA-UAMM. Mante, México.

^b Instituto Politécnico Nacional. UPIIZ-, Zacatecas, México.

^c Universidad Autónoma de Tamaulipas IBI. UAMM. Mante, México

^d Instituto Politécnico Nacional. Centro de Biotecnología Genómica. Laboratorio de Biotecnología Animal. Blvd. Del Maestro esq. Elías Piña. Col. Narciso Mendoza s/n. Cd. Reynosa, Tam. México.

^e Universidad Autónoma de Chihuahua. Facultad de Zootecnia y Ecología. Chihuahua, México.

*Autor de correspondencia: asifuentes@ipn.mx

Resumen:

La reproducción es un elemento clave en los sistemas de producción de ganado bovino. Se han aplicado los enfoques de biología de sistemas, incluidos los que involucran las redes de genes, a la disección genética de fenotipos complejos de ganado. Se hizo un análisis de la red proteína-proteína, incluyendo un conjunto de 385 genes asociados con rasgos reproductivos

en el ganado, para identificar y priorizar genes candidatos relacionados con las diferencias fenotípicas en la reproducción del ganado. Los genes que pertenecen a la familia de la ubiquitina - Ubiquitina C (*Ubc*, ID del gen: 444874) y Ubiquitina B (*Ubb*, ID del gen: 281370) - presentaron la mayor probabilidad de estar asociados con estos rasgos en el ganado. Se identificaron ambas proteínas como centros muy importantes en una red de interacción proteína-proteína ya que cada una tienen 3,775 interacciones de 3,856 posibles. Al resecuenciar la región de codificación del gen *Ubb* para evaluar la presencia de SNP en una población de descubrimiento, se identificó la transversión G/T (rs110366695), que provoca la aparición de un codón de terminación y una proteína truncada en 287 aa. Las distribuciones de frecuencia alélicas descubiertos en dos razas de ganado vacuno podrían justificar investigaciones adicionales enfocados en explorar tanto los efectos del truncamiento de proteínas como el potencial de estas proteínas como marcadores moleculares para la calidad del semen.

Palabras clave: *Bos taurus*, Marcadores moleculares, Calidad de semen, Ubiquitinización.

Received: 25/02/2019

Accepted: 28/08/2019

La identificación de los genes que codifican rasgos complejos se ha logrado tradicionalmente por medio del escaneo del genoma entero en conjunto con el enfoque del gen candidato. Sin embargo, estos métodos no constituyen una estrategia confiable para la exploración sistemática de una red genética en la cual ocurre variación fenotípica en rasgos complejos⁽¹⁾.

Las redes de proteínas proporcionan una visión general de la organización genética a nivel de los sistemas y permiten la disección de los módulos funcionales que subyacen a los rasgos complejos. Esto facilita la predicción de nuevos genes candidatos para un rasgo⁽²⁾. En el ganado bovino, se han utilizado algunos enfoques relacionados con las redes de interacción para identificar los genes candidatos relacionados con diferencias fenotípicas. Algunos ejemplos de estos comprenden: el marmoleado⁽³⁾, los genes involucrados en el estro (comportamiento) en el ganado lechero⁽⁴⁾ y los polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) asociados con rasgos de crecimiento en vacas de la raza Charolais en México⁽⁵⁾.

La reproducción es un elemento esencial en la producción de ganado y los rasgos genéticos de la fertilidad tienen una relevancia económica muy significativa. Este proceso complejo involucra varios eventos consecutivos, los cuales incluyen la gametogénesis, la fertilización y el desarrollo embrionario temprano, entre otros. Ellos deben de ocurrir de una manera bien orquestada para lograr una preñez exitosa⁽⁶⁾.

Una mejor comprensión de los mecanismos que controlan los rasgos de fertilidad a nivel orgánico, celular y molecular podría ayudar en el desarrollo de estrategias diseñadas para mejorar o controlar la fertilidad⁽⁴⁾. El objetivo de este trabajo fue aplicar una red de interacción funcional para guiar a la identificación de los genes clave que controlan los rasgos reproductivos en el ganado bovino y explorar la variación genética dentro de estos genes para descubrir los que tienen el potencial de estar asociados con rasgos reproductivos.

Se llevó a cabo una revisión de la literatura. Se utilizó el software Genie (http://cbdm-01.zdv.uni-mainz.de/~jfontain/cms/?page_id=6) para extraer de texto basada en el PubMed a los genes que se han asociado previamente con rasgos reproductivos en bovinos (es decir, los genes de referencia). Para identificar y priorizar los genes candidatos para la red funcional se extrajeron las interacciones de los genes de referencia y se calculó el grado de asociación con la reproducción (DAR, por sus siglas en inglés) en la subred para cada uno de los genes usando la siguiente fórmula:

$$DAR = \sum_{j \in \text{ref genes}} W_{ij} \cdot \sum_{j \in \text{ref genes}} P_{ij}$$

Donde W_{ij} es el peso del enlace que conecta la proteína i a la proteína de referencia j ; y P_{ij} es el número de enlaces que conectan la proteína i a la proteína de referencia j (excluyéndose a sí mismo). Desde luego, la probabilidad de que cada una de estas proteínas está asociada con la reproducción se evaluó considerando sus interacciones con otros genes cuyas funciones biológicas se saben están relacionadas con la reproducción⁽⁵⁾. La selección de los genes candidatos asociados con las variaciones fenotípicas en los rasgos reproductivos se hizo por medio de la puntuación DAR. Con ésta se calculó el valor predictivo positivo (VPP), el cual representa la probabilidad de que un gen esté asociado con la reproducción; el criterio de selección fue el VPP más alto resultando de este análisis, es decir, 0.3^(5,7).

De los genes candidatos identificados, se seleccionó el gen Ubiquitina B (*Ubb*) como blanco. Luego se analizó la variación genética en el *Ubb* utilizando once muestras de ADN de cuatro razas de ganado diferentes (3 Holstein, 2 Charolais, 3 Brahman y 3 Angus). Los cebadores UBB-F 5'-GAGAGATTTGTGAGAGATCTTGACG-3' y UBB-R 5'-CCATTTAACCTGTTGAGTACCCA-3' fueron diseñados para cubrir y resecuenciar el *Ubb* bovino (número de acceso GenBank: AC_000176.1). Se purificaron los fragmentos producidos en el PCR usando el Exo-SAP-it (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE.UU.). Se hizo la secuenciación bidireccional por medio del procedimiento BigDye[®] Terminator y usando un secuenciador de ADN ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.UU.). Las secuencias se alinearon con el programa de ClustalX 2.0.8⁽⁸⁾.

Por medio de la inspección visual de los cromatogramas de secuencia se confirmó la presencia de los SNP en las secuencias resultantes. Se definieron a los SNP de acuerdo a su presencia en la población de selección asociada con los tres genotipos esperados.

Se diseñaron sitios de restricción creados por la amplificación y acoplados al PCR (PCR-ACRS) para identificar los genotipos del SNP no sinónimo rs110366695 encontrados en el anterior cribado de secuenciación. Después de la PCR, se digirieron a los fragmentos usando 2.5 U del enzima *Hinf* I para luego analizarlos en un gel de agarosa al 2.5%. Se observaron los siguientes patrones de digestión: 210+132+130+18 pb (alelo G), y 210+155+150 pb (alelo T).

Se identificaron los genotipos de una población de sesenta y siete toros jóvenes de las razas Angus y Charolais usando el PCR-ACRS. Las frecuencias alélicas y genotípicas se calcularon para cada raza y se probaron las desviaciones del equilibrio de Hardy-Weinberg con el paquete estadístico GENEPOP versión 4.2⁽⁹⁾.

Un conjunto de 385 genes de referencia asociados con rasgos reproductivos en bovinos se identificó por medio de sus SNP, sus perfiles de expresión o su función biológica. Según el VPP, los genes que presentaban un $DAR \geq 11$ tenían una probabilidad superior al 33% de estar asociados con rasgos reproductivos en el ganado. Los que cumplían este criterio pertenecían a la familia de la ubiquitina: Ubiquitina C (*Ubc*; ID del gen: 444874) y B (*Ubb*; ID del gen: 281370).

Se determinó la importancia de estas proteínas, *Ubb* y *Ubc*, en la topología de la red de interacción en base con el número de interacciones de las cuales forman parte. Tanto *Ubb* como *Ubc* tienen 3,775 interacciones de 3,856 posibles, indicando que ambas son centros muy importantes. Por medio de la herramienta BiNGO (por sus siglas en inglés - Biological Network Gene Ontology) (<https://www.psb.ugent.be/cbd/papers/BiNGO>), se identificó que en la subred que forma *Ubb* y *Ubc* la anotación de “Gene Ontology 51094” (lo cual significa la “regulación positiva del proceso de desarrollo”) tiene un valor de p de 4.8 E-09, lo que indica una sobrerrepresentación. Este resultado tiene sentido y está relacionado con la reproducción en el ganado ya que este término del proceso biológico se refiere a cualquier proceso que activa o aumenta la tasa o la extensión del desarrollo y el resultado específico de lo cual es la progresión de un organismo a lo largo del tiempo desde una condición inicial (por ejemplo, un cigoto, o un adulto joven) a una condición posterior (por ejemplo, un animal multicelular o un adulto de edad avanzada). Este se vea apoyado en la representación de las interacciones del *Ubb* y *Ubc* con 23 módulos de genes de referencia, es decir, genes previamente asociados con la reproducción en bovinos (Figura 1)⁽⁸⁻³³⁾.

L

a proteína ubiquitina (Ub) es común en todas las células eucariotas. La conservación de su estructura sugiere que tiene un papel importante en el metabolismo celular. A través del proceso de la ubiquitinación, el Ub guía la degradación de la proteína y regula diferentes eventos biológicos como son la progresión del ciclo celular, la endocitosis membrana-receptor, la aparición de antígenos en el sistema inmune e incluso la infección retroviral⁽³⁴⁾. La ubiquitinación se logra mediante la unión covalente del 76-AA ubiquitina (8.5 kDa) al grupo ϵ -amino en los residuos Lys del sustrato a través del residuo AA C-terminal de la ubiquitina (G76). Este proceso requiere de la hidrólisis de ATP y un conjunto de factores para la conjugación de ubiquitina, entre ellos las enzimas activadoras de ubiquitina (UBA) y los conjugadores de ubiquitina (*Ubc*)⁽¹¹⁾.

De las múltiples funciones del sistema Ub, las que participan en los procesos de desarrollo y reproducción son especialmente relevantes. Su papel en el desarrollo se ha estudiado usando modelos como las transiciones del desarrollo en *Dictyostelium discoideum* y la especificidad del desarrollo en *Caenorhabditis elegans*^(35,36). Se sabe que el sistema Ub está involucrado en la embriogénesis en pollitos, así como en la miogénesis y el desarrollo del cerebro en los humanos⁽³⁴⁾. En cuanto a los procesos reproductivos, en los humanos la Ub es la proteína principal en el plasma seminal, y el sistema de ubiquitinación se ha relacionado con problemas de fertilidad en humanos y otras especies, incluido el ganado^(37,38). En varias especies una alta proporción de espermatozoides ubiquitinados en el eyaculado está relacionada con infertilidad⁽³⁸⁾.

En el ganado bovino, un aumento en los niveles de ubiquitina está asociado con un aumento en los niveles de daño al ADN espermático y con una reducción en la fertilidad⁽³⁹⁾. En los toros se ha reportado una correlación negativa entre el nivel de ubiquitina de los espermatozoides y el recuento de espermatozoides, la movilidad y el porcentaje de morfología normal; es decir, niveles elevados de ubiquitina en los espermatozoides auguran una mala calidad del semen y una baja fertilidad⁽³⁹⁾. A raíz de esta evidencia se puede utilizar a los espermatozoides ubiquitinados como una herramienta eficaz para identificar algunos problemas de fertilidad^(40,41). Aunque existan evidencias de que los mecanismos biológicos en los sistemas de ubiquitinación puedan afectar la fertilidad en diferentes especies, el proceso del marcado de la ubiquitina de los espermatozoides y el papel que juega este proceso en la biología de los espermatozoides todavía no se entiende por completo.

Al buscar datos adicionales para apoyar la posibilidad de que estos genes pueden ser genes candidatos, se logró la caracterización molecular del gen del *Ubb*. Según la base de datos del NCBI la longitud del gen es de 1898 pb y contiene un exón en la posición 841 a 1758. En esta base de datos se han reportado 19 SNP en las secuencias codificantes y 15 SNP en los no codificantes. El fragmento 1328 pb amplificado permitió la identificación de 5 SNP en la población de estudio, 3 (rs109592218, rs110007734 y rs110366695) en la región codificante y 2 (rs720990890 y rs439271103) en la región no codificante. La transversión rs110366695

genes del hígado regulados de manera diferencial durante el período de transición, la determinación de las adaptaciones hepáticas que se producen al final de la gestación; **M)** Genes regulados de manera diferencial en el oviducto de vacas en diestro en comparación con el estro; **N)** Genes en las células del cúmulo regulados por la oleada de LH, células del cúmulo en desarrollo y la fertilidad de los ovocitos; **O)** Genes regulados de manera diferencial en diferentes etapas de la maduración de los ovocitos; **P)** Tasa de concepción relativa estimada, mérito neto y rendimiento de grasa; **Q)** Tasa de parto (ganado de vacuno), mérito neto, porcentaje de grasa y vida productiva; **R)** SNP relacionados con el intervalo a la inseminación; **S)** Desarrollo embrionario en la etapa del blastocisto; **T)** Regulación diferencial en células cúmulos de embriones *in vivo* en comparación con embriones *in vitro*; **U)** El anti-apoptótico en los embriones mejora la competencia del embrión; **V)** Genes mamarios regulados de manera diferencial durante la lactancia.

Hasta la fecha no hay estudios moleculares enfocados en la evaluación de los efectos de la variación genética de *Ubb* en la calidad del semen, a pesar de la importancia fisiológica del gen *Ubb*. Los resultados del presente estudio respaldan el gen *Ubb* como un gen candidato fuerte con variaciones genéticas que se deben de probar para confirmar su asociación con rasgos reproductivos. Desafortunadamente, en México el análisis de fenotipos para los rasgos reproductivos no es una práctica común. Este hecho resalta la necesidad de preparar una base de datos amplia para permitir la confirmación de su influencia genética en estos rasgos, particularmente de la transversión rs110366695 (G/T).

Una red de interacción proteína-proteína basada en el análisis ha sido validada previamente como una herramienta útil en la identificación de los genes causales asociados con rasgos económicos en bovinos y otras especies. Los resultados obtenidos proporcionan información sobre el potencial de *Ubb* y de *Ubc* como genes candidatos para los rasgos reproductivos, en particular para la calidad del semen. Resaltan la importancia de una exploración más a fondo tanto sobre los efectos del truncamiento de las proteínas como su potencial como marcador molecular.

Agradecimientos

La investigación reportada aquí recibió apoyo económico de los proyectos CONACYT 294826 y SIP 20195072.

Literatura citada:

1. Jiang Z, Ott TL. Reproductive genomics in domestic animals. Iowa, USA: Wiley-Blackwell; 2010.

2. Lee T, Hwang S, Kim CY, Shim H, Kim H, Ronald P, *et al.* WheatNet: A genome-scale functional network for hexaploid bread wheat, *Triticum aestivum*. *Mol Plant* 2017;(8):1133-1136.
3. Lim D, Kim NK, Park HS, Lee SH, Cho YM, Oh SJ, *et al.* Identification of candidate genes related to bovine marbling using protein-protein interaction networks. *Int J Biol Sci* 2011;(7):992-1002.
4. Hulsegge I, Woelders H, Smits M, Schokker D, Jiang L, Sørensen P. Prioritization of candidate genes for cattle reproductive traits, based on protein-protein interactions, gene expression, and text-mining. *Physiol Genomics* 2013;(10):400-406.
5. Paredes-Sánchez FA, Sifuentes-Rincón AM, Segura CA, García PCA, Parra BGM, Ambriz MP. Associations of SNPs located at candidate genes to bovine growth traits, prioritized with an interaction networks construction approach. *BMC Genet* 2015;(91):1-12.
- 6.- Han Y, Peñagaricano F. Unravelling the genomic architecture of bull fertility in Holstein cattle. *BMC Genet* 2016;(1):143.
7. Garza-Brenner E, Sifuentes-Rincón AM, Randel RD, Paredes-Sánchez FA, Parra-Bracamonte GM, *et al.* Association of SNPs in dopamine and serotonin pathway genes and their interacting genes with temperament traits in Charolais cows. *J Appl Genet* 2016;(3):1-9.
8. Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, *et al.* Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 2007;(21):2947-2848.
9. Raymond M, Rousset F. GENEPOP (Version 1.2): Population genetics software for exact tests and ecumenicism. *J Heredity* 1995;(3):248-249.
- 10.- Cory AT, Price CA, Lefebvre R, Palin MF. Identification of single nucleotide polymorphisms in the bovine follicle-stimulating hormone receptor and effects of genotypes on superovulatory response traits. *Anim Genet* 2013;(2):197-201.
- 11.- Hoelker M, Rings F, Lund Q, Ghanem N, Phatsara C, Griese J. Effect of the microenvironment and embryo density on developmental characteristics and gene expression profile of bovine preimplantative embryos cultured *in vitro*. *Reproduction* 2009;(3):415-425.
- 12.- Cochran SD, Cole JB, Null DJ, Hansen PJ. Discovery of single nucleotide polymorphisms in candidate genes associated with fertility and production traits in Holstein cattle. *BMC Genet* 2013;(49):14-49.
- 13.- Fair T, Carter F, Park S, Evans AC, Lonergan P. Global gene expression analysis during bovine oocyte *in vitro* maturation. *Theriogenology* 2007;(68):91-97.

- 14.- Salilew WD, Hölker M, Rings F, Ghanem N, Ulas-Cinar M, Peippo J, *et al.* Bovine pretransfer endometrium and embryo transcriptome fingerprints as predictors of pregnancy success after embryo transfer. *Physiol Genomics* 2010;(2):201-218.
- 15.- Loureiro B, Oliveira LJ, Favoreto MG, Hansen PJ. Colony-stimulating factor 2 inhibits induction of apoptosis in the bovine preimplantation embryo. *Am J Reprod Immunol* 2011;(65):578-588.
- 16.- Cerri RL, Thompson IM, Kim IH, Ealy AD, Hansen PJ, Staples CR, *et al.* Effects of lactation and pregnancy on gene expression of endometrium of Holstein cows at day 17 of the estrous cycle or pregnancy. *J Dairy Sci* 2012;(10):5657-575.
- 17.- Fayad T, Lévesque V, Sirois J, Silversides DW, Lussier JG. Gene expression profiling of differentially expressed genes in granulosa cells of bovine dominant follicles using suppression subtractive hybridization. *Biol Reprod* 2004;(2):523-533.
- 18.- Misirlioglu M, Page GP, Sagirkaya H, Kaya A, Parrish JJ, First NL, *et al.* Dynamics of global transcriptome in bovine matured oocytes and preimplantation embryos. *Proc Natl Acad Sci* 2006;(50):18905-18910.
- 19.- Cochran SD, Cole JB, Null DJ, Hansen PJ. Single nucleotide polymorphisms in candidate genes associated with fertilizing ability of sperm and subsequent embryonic development in cattle. *Biol Reprod* 2013;(3):1-7.
- 20.- Bonilla AQ, Oliveira LJ, Ozawa M, Newsom EM, Lucy MC, Hansen PJ. Developmental changes in thermoprotective actions of insulin-like growth factor-1 on the preimplantation bovine embryo. *Mol Cell Endocrinol* 2011;(1-2):170-179.
- 21.- Mamo S, Sargent CA, Affara NA, Tesfaye D, El-Halawany N, Wimmers K, Gilles M, Schellander K, Ponsuksili S. Transcript profiles of some developmentally important genes detected in bovine oocytes and in vitro-produced blastocysts using RNA amplification and cDNA microarrays. *Reprod Domest Anim* 2006;(6):527-534.
- 22.- Graber M, Kohler S, Kaufmann T, Doherr MG, Bruckmaier RM, van Dorland HA. A field study on characteristics and diversity of gene expression in the liver of dairy cows during the transition period. *J Dairy Sci* 2010;(1):5200-5215.
- 23.- Bauersachs S, Rehfeld S, Ulbrich SE, Mallok S, Prelle K, Wenigerkind H, *et al.* Monitoring gene expression changes in bovine oviduct epithelial cells during the oestrous cycle. *J Mol Endocrinol* 2004;(2):449-466.
- 24.- Assidi M, Dieleman SJ, Sirard MA. Cumulus cell gene expression following the LH surge in bovine preovulatory follicles: potential early markers of oocyte competence. *Reproduction* 2010;(6):835-852.

- 25.- Salhab M, Tosca L, Cabau C, Papillier P, Perreau C, Dupont J, *et al.* Kinetics of gene expression and signaling in bovine cumulus cells throughout IVM in different mediums in relation to oocyte developmental competence, cumulus apoptosis and progesterone secretion. *Theriogenology* 2011;(1):90-104.
- 26.- Khatib H, Monson RL, Huang W, Khatib R, Schutzkus V, Khateeb H, *et al.* Short communication: Validation of in vitro fertility genes in a Holstein bull population. *J Dairy Sci* 2010;(93):2244-2249.
- 27.- Rosenkrans Jr C, Banks A, Reiter S, Looper M. Calving traits of crossbred Brahman cows are associated with Heat Shock Protein 70 genetic polymorphisms. *Anim Reprod Sci* 2010;(3-4):178-182.
- 28.- Pimentel EC, Bauersachs S, Tietze M, Simianer H, Tetens J, Thaller G, *et al.* Exploration of relationships between production and fertility traits in dairy cattle via association studies of SNPs within candidate genes derived by expression profiling. *Anim Genet* 2011;(3):251-262.
- 29.- Gad A, Besenfelder U, Rings F, Ghanem N, Salilew-Wondim D, Hossain MM, *et al.* Effect of reproductive tract environment following controlled ovarian hyperstimulation treatment on embryo development and global transcriptome profile of blastocysts: implications for animal breeding and human assisted reproduction. *Hum Reprod* 2011;(7):1693-1707.
- 30.- Tesfaye D, Worku D, Rings F, Phatsara C, Tholen E, Schellander K, *et al.* Identification and expression profiling of microRNAs during bovine oocyte maturation using heterologous approach. *Mol Reprod Dev* 2009;(7):665-677.
- 31.- Jousan FD, Hansen PJ. Insulin-like growth factor-I promotes resistance of bovine preimplantation embryos to heat shock through actions independent of its anti-apoptotic actions requiring PI3K signaling. *Mol Reprod Dev* 2007;(2):189-196.
- 32.- Mani O, Körner M, Sorensen MT, Sejrsen K, Wotzkow C, Ontsouka CE, *et al.* Expression, localization, and functional model of cholesterol transporters in lactating and nonlactating mammary tissues of murine, bovine, and human origin. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2010;(2):642-654.
- 33.- Fortes MR, Reverter A, Nagaraj SH, Zhang Y, Jonsson NN, Barris W, *et al.* A single nucleotide polymorphism-derived regulatory gene network underlying puberty in 2 tropical breeds of beef cattle. *J Anim Sci.* 2011;(6):1669-1683.
- 34.- Bebington C, Doherty FJ, Fleming SD. The possible biological and reproductive functions of ubiquitin. *Hum Reprod Update* 2001;(1):102-111.

- 35.- Clark A, Nomura A, Mohanty S, Firtel RA. A ubiquitin-conjugating enzyme is essential for developmental transitions in *Dictyostelium*. *Mol Biol Cell* 1997;(8):1989-2002.
- 36.- Zhen M, Schein JE, Baille DL, Peter E, Candido M. An essential ubiquitin conjugating enzyme with tissue and developmental specificity in the nematode *C. elegans*. *EMBO J* 1996;(15):3229-3237
- 37.- Muratori M, Marchiani S, Forti G, Baldi E. Sperm ubiquitination positively correlates to normal morphology in human semen. *Hum Reprod* 2005;(20):1035-1043.
- 38.- Sutovsky P, Geary T, Baska KM, Manandhar G, Feng D, Lovercamp KW, Sutovsky M. Ubiquitin as an objective marker of semen quality and fertility in bulls. *Proc Nebraska Appl Reprod Strat in Beef Cattle* 2004;185-199.
- 39.- Rodríguez-Lozano I, Ávalos-Rodríguez A, Castillo-Juárez H, Borderas-Tordesillas F, Roa-Vidal JJ, Rosales-Torres AM. Percentage of ubiquitinated spermatozoa does not correlate with fertilizing capacity of thawed bovine semen. *Reprod Dom Anim* 2013;(1):27-31.
- 40.- Sutovsky P, Terrada Y, Schatten G. Ubiquitin-based sperm assay for the diagnosis of male factor infertility. *Hum Reprod* 2001;(2):250–258.
- 41.- Sutovsky P, Hauser R, Sutovsky M. Increased levels of sperm ubiquitin correlate with semen quality in men from an andrology laboratory clinic population. *Hum Reprod* 2004;(3):628–638.