Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Campus de Botucatu

CORRELAÇÃO DOS ÍNDICES DE MOTILIDADE E VELOCIDADE E SUBPOPULAÇÕES COM O PROTEOMA DAS CÉLULAS ESPERMÁTICAS DE TOUROS

PAULINA BETANCUR GUERRA

Botucatu
2026

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

CORRELAÇÃO DOS ÍNDICES DE MOTILIDADE E VELOCIDADE E SUBPOPULAÇÕES COM O PROTEOMA DAS CÉLULAS ESPERMÁTICAS DE TOUROS

Dissertação apresentada junto ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia Animal para obtenção do título de Mestre

Paulina Betancur Guerra
Orientadora: Profa. Dra. Fabiana Ferreira de Souza
Coorientadora: Profa. Dra. Viviana Vallejo Aristizábal

G934

Guerra, Paulina Betancur

Correlação dos índices de motilidade e velocidade e subpopulações com o proteoma das células espermáticas de touros / Paulina Betancur Guerra. -- Botucatu, 2026

107 p.

Dissertação (mestrado profissional) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu

Orientadora: Fabiana Ferreira de Souza

Coorientadora: Viviana Vallejo Aristizábal

1. Reprodução. 2. Andrologia veterinária. 3. Touros. 4. Reprodutores. 5. Animais. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Dados fornecidos pelo autor(a).

Nome da autora: Paulina Betancur Guerra

Título: CORRELAÇÃO DOS ÍNDICES DE MOTILIDADE E VELOCIDADE E SUBPOPULAÇÕES COM O PROTEOMA DAS CÉLULAS ESPERMÁTICAS DE TOUROS

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Fabiana Ferreira de Souza
Presidente e Orientadora
Departamento de Cirurgia Veterinária e Reprodução Animal, FMVZ - UNESP - Botucatu/SP

Prof. Dr. João Carlos Pinheiro Ferreira
Membro Titular
Departamento de Cirurgia Veterinária e Reprodução Animal, FMVZ - UNESP - Botucatu/SP

Profa. Dra. Elisa Giaretta
Membro Titular
Dipartimento de Biomedicina Comparata e Alimentazione, BCA, Università degli Studi di Padova

Data da defesa: 03 de fevereiro de 2026.

AGRADECIMENTOS

À **Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP de Botucatu/SP**, à **Central Bela Vista** e a **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Brasil (código de financiamento 001)**, pela infraestrutura, qualidade e suporte técnico oferecidos para a realização deste trabalho.

À **equipe de trabalho**, pela colaboração, companheirismo e troca constante de aprendizado. Agradeço pela ajuda nos momentos de desafio e pela parceria que tornou essa jornada mais enriquecedora.

Agradeço à Professora **Fabiana Ferreira de Souza**, por sua orientação, confiança e constante disposição para me guiar durante esta etapa. Muito obrigada pela dedicação e por me inspirar com sua paixão pela ciência, por acreditar em mim e no meu trabalho.

À **Elisa Giaretta**, minha orientadora na Itália, e a toda a equipe do laboratório, pelo carinho, dedicação e por me receberem tão bem durante minha estadia. Agradeço por toda a ajuda, paciência e aprendizado compartilhado nesse período.

Aos meus amigos, **Yasmin, Daniela**, **Francisco, Ramon, Cíntia**, **Henrique, Giovanna** e **Fabiano**, por estarem sempre presentes, me acompanharem em cada passo, por me ouvirem e levantarem meu ânimo nos dias difíceis. Obrigada por navegarem comigo pelos mares da incerteza e enfrentarem comigo as dificuldades. Vocês foram um lembrete constante de que a vida é muito melhor quando compartilhada com amigos. Cada conversa, cada mensagem de apoio e cada risada me deram forças para continuar.

À **minha família**, pelo amor incondicional e por serem meu refúgio, mesmo à distância. Obrigada por apoiarem minhas ideias – por mais loucas que possam parecer – e por serem sempre o lugar seguro ao qual posso voltar. Agradeço sua paciência e constante ânimo.

À minha mãe, **Marleny Guerra**, por seu amor incondicional, pela força e pela fé que sempre depositou em mim. Obrigada por me ensinar, com seu exemplo, a nunca desistir dos meus sonhos, mesmo nos momentos difíceis.

Ao meu irmão, **Simón Betancur**, por seu companheirismo, leveza e apoio constante. Obrigada pelas conversas quando eu precisava e por estar sempre, mesmo em silêncio.

Ao meu primo, **Daniel Rolón**, por ser sempre um guia e um conselheiro em minha vida. Por estar presente em cada etapa com palavras de apoio e sabedoria. Agradeço pelas conversas profundas, por sempre espalhar a mensagem de paz e tranquilidade. Obrigada por me lembrar da importância de desacelerar e encontrar serenidade, mesmo nos momentos de incerteza.

Esta conquista é de todas as pessoas que, de alguma forma, fizeram parte deste caminho. Obrigada, sem vocês nada disso seria possível.

Eu sou quem sou graças a cada uma das pessoas que cruzaram meu caminho. Meu agradecimento é eterno por todo o apoio, carinho e presença ao longo desta jornada.

Impacto da Pesquisa

A integração de análises cinemáticas espermáticas e proteômica para compreender a heterogeneidade espermática em touros contribui para o avanço do conhecimento sobre a fisiologia reprodutiva. A abordagem molecular, associada às análises multivariadas, possibilita a identificação de biomarcadores relacionados à fertilidade e o reconhecimento de padrões de motilidade espermática mais eficientes. Os resultados estimulam a formulação de novas pesquisas que permitam refinar modelos preditivos de desempenho reprodutivo, auxiliando na seleção de ejaculados de melhor qualidade.

Este estudo busca aprimorar a eficiência no processo de seleção de ejaculados bovinos, contribuindo para a redução de custos na criopreservação do sêmen. Indiretamente, seus resultados promovem a segurança alimentar, o bem-estar animal e o fortalecimento da economia do setor agropecuário. A pesquisa está alinhada aos Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS) da Agenda 2030 da ONU, especialmente o ODS 2 (Fome Zero e Agricultura Sustentável), ODS 9 (Indústria, Inovação e Infraestrutura) e ODS 12 (Consumo e Produção Responsáveis), incentivando práticas mais eficientes e sustentáveis.

Research Impact

The integration of sperm kinematic analysis and proteomics to understand sperm heterogeneity in bulls contributes to advancing knowledge of reproductive physiology. The molecular approach, combined with multivariate analysis, enables the identification of fertility-related biomarkers and the recognition of more efficient sperm motility patterns. The results encourage the development of new research to refine predictive models of reproductive performance and support the selection of higher-quality ejaculates.

This study aims to improve efficiency in the selection process of bovine ejaculates, contributing to cost reduction in semen cryopreservation. Indirectly, its findings promote food security, animal welfare, and the strengthening of the livestock sector’s economy. The research aligns with the United Nations 2030 Agenda for Sustainable Development Goals (SDGs), particularly SDG 2 (Zero Hunger and Sustainable Agriculture), SDG 9 (Industry, Innovation and Infrastructure), and SDG 12 (Responsible Consumption and Production), encouraging more efficient and sustainable practices.

En memoria de Rubén Dario Guerra,
por ser inspiración y amor.
Gracias por hacer parte de lo que soy

"En semejante mundo en el que todo se cuenta, el arma más fácilmente accesible y a la vez más mortal es la divulgación"

Milán Kundera

RESUMO

GUERA, P.B. **CORRELAÇÃO DOS ÍNDICES DE MOTILIDADE E VELOCIDADE E SUBPOPULAÇÕES COM O PROTEOMA DAS CÉLULAS ESPERMÁTICAS DE TOUROS**. Botucatu – SP. 2026. 107p. Defesa (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

A motilidade é um atributo fundamental de ejaculados férteis. No entanto, dentro de um mesmo ejaculado, os espermatozoides exibem padrões de motilidade distinto, e o significado biológico das subpopulações ainda é pouco compreendido. Este estudo foi composto por 2 experimentos. O primeiro experimento comparou a classificação automática do sistema de análise espermática assistira por computador (CASA) com uma abordagem de agrupamento multivariado para identificar subpopulações (SPs) espermáticas. A PCA foi utilizada para reduzir as variáveis em dois componentes principais, seguida do agrupamento pelo método k-means. As classificações obtidas pelo CASA foram então comparadas com os resultados do agrupamento utilizando o índice de Jaccard. Ambos os métodos identificaram 3 subpopulações espermáticas; no entanto, a abordagem de agrupamento k-means proporcionou uma separação mais clara dos grupos e menor sobreposição entre eles. Esses resultados segurem que métodos estatísticos multivariados permitem uma caracterização mais detalhada da heterogeneidade espermática do que a classificação automática do sistema CASA. O segundo teve como objetivo caracterizar SPs cinemáticas de espermatozoides em touros, avaliar os efeitos da criopreservação sobre sua distribuição e investigar associações entre os padrões de motilidade espermática o e proteoma dos espermatozoides. Adicionalmente, foi avaliado o valor preditivo de índices cinemáticos derivados do CASA para a qualidade do sêmen pós-descongelamento. Amostras de sêmen foram colhidas de 10 touros e analisadas antes e após o descongelamento, utilizando o CASA e técnicas de proteômica. As SPs cinemáticas foram identificadas com PCA, seguida de agrupamento pelo método k-means. O proteoma espermático foi analisado utilizando nLC-ESI Orbitrap MS/MS, e os resultados foram correlacionados com as SPs identificadas. Foram determinadas 3 SPs distintas, possibilitando o desenvolvimento de índices de velocidade e movimento. A criopreservação alterou a distribuição das SPs, com redução daquelas caracterizadas por movimento rápido não progressivo e padrão semelhante à hiperativação, e aumente da subpopulação com motilidade progressiva moderada. Os espermatozoides progressivamente móveis estiveram associados a proteínas relacionadas à resposta ao estresse celular e à homeostase proteica, enquanto padrões semelhantes à hiperativação se associaram a proteínas envolvidas na estrutura flagelar, na sinalização por cálcio e no metabolismo mitocondrial. Os resultados demonstram que as subpopulações espermáticas refletem estados funcionais distintos e respondem de forma diferentes à criopreservação, destacando a importância da integração entre análises cinemáticas e proteômicas para a avaliação da qualidade seminal.

Palavras-chave: bovino, agrupamento, proteômica, CASA-Mot

ABSTRACT

GUERA, P.B. **CORRELATION OF MOTILITY AND VELOCITY INDICES AND SUBPOPULATIONS WITH THE PROTEOME OF BULL SPERM CELLS**. Botucatu – SP. 2026. 107p. Defense (Master's Degree) – Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science, Botucatu Campus, São Paulo State University (UNESP).

Motility is a fundamental attribute of fertile ejaculates. However, within a single ejaculate, sperm exhibit distinct motility patterns, and the biological significance of these subpopulations is still poorly understood. This study comprised two experiments. The first experiment compared the automatic classification provided by a computer-assisted sperm analysis (CASA) system with a multivariate clustering approach to identify sperm subpopulations (SPs). Principal component analysis (PCA) was used to reduce the variables into two principal components, followed by clustering using the k-means method. The classifications obtained by CASA were then compared with the clustering results using the Jaccard index. Both methods identified three sperm SPs; however, the k-means clustering approach provided clearer group separation and less overlap among them. These results suggest that multivariate statistical methods allow a more detailed characterization of sperm heterogeneity than the automatic classification provided by the CASA system. The second experiment aimed to characterize kinematic sperm SPs in bulls, evaluate the effects of cryopreservation on their distribution, and investigate associations between sperm motility patterns and the sperm proteome. Additionally, the predictive value of CASA-derived kinematic indices for post-thaw semen quality was assessed. Semen samples were collected from ten bulls and analyzed before freezing and after thawing using CASA system and proteomic techniques. Kinematic SPs were identified through PCA followed by k-means clustering. The sperm proteome was analyzed using nLC-ESI Orbitrap MS/MS, and the results were correlated with the identified SPs. Three distinct SPs were determined, enabling the development of velocity and movement indices. Cryopreservation altered the distribution of SPs, with a reduction in those characterized by fast non-progressive motion and hyperactivation-like patterns, and an increase in the subpopulation exhibiting moderate progressive motility. Progressively motile sperm were associated with proteins related to cellular stress response and protein homeostasis, whereas hyperactivation-like patterns were associated with proteins involved in flagellar structure, calcium signaling, and mitochondrial metabolism. The results demonstrate that sperm subpopulations reflect distinct functional states and respond differently to cryopreservation, highlighting the importance of integrating kinematic and proteomic analyses for the assessment of semen quality.

Keywords: bovine; clustering; proteomics; CASA-Mot

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 1
1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA 2
2. REVISÃO DE LITERATURA 3
2.1. Célula espermática 3
2.2. Fisiologia espermática 5
2.3. Avaliação da qualidade espermática 6
2.4. Análise seminal computadorizado (CASA) 8
2.5. Subpopulações espermáticas 12
2.6. Criopreservação do sêmen 14
2.7. Proteômica 15
3. HIPÓTESE E OBJETIVOS 18
3.1 Hipótese 18
3.2 Objetivos 18
5. REFERÊNCIAS 19
CAPÍTULO 2 32
CAPÍTULO 3 37
ARTIGO CIENTÍFICO II 38
Uncovering the crosstalk between bull kinematic subpopulations and sperm proteome 38
GRAPHICAL ABSTRACT 39
ABSTRACT 39
1. Introduction 41
2. Material and methods 42
3. Results 48
4. Discussion and conclusions 55
Acknowledgements 60
Author contributions 61
Data availability 61
Declaration of competing interests 61
Declaration of Generative AI and AI-assisted technologies in the writing process 61
References 62
Supplementary Material 1 70

Supplementary Material 2 75

CAPÍTULO 1

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

O mercado de sêmen criopreservado possui grande relevância para a produção animal, pois possibilita a ampla disseminação de material genético e contribui para o melhoramento dos rebanhos de forma rápida e eficiente (Medeiros et al., 2002). Nesse contexto, o Brasil se destaca como um dos maiores produtores e exportadores mundiais de sêmen bovino, tendo alcançado 20,5 milhões de doses produzidas em 2024 (Ziehlsdorff, 2025). A crescente demanda por material genético aumenta a necessidade de desenvolver metodologias inovadoras para avaliar a qualidade e viabilidade espermática pós-descongelação, bem como de identificar biomarcadores que permitam predizer a congelabilidade e o potencial de fertilidade (Ugur et al., 2019). Uma avaliação mais precisa da qualidade do sêmen é essencial para reduzir perdas reprodutivas e otimizar os resultados produtivos.

A avaliação do sêmen é um procedimento rotineiro e fundamental na reprodução animal, sendo amplamente utilizada para estimar o potencial de fertilidade dos machos (Vantman et al., 1989). Durante a análise do sêmen, são avaliadas características macroscópicas (cor, odor, volume, aspecto) e microscópicas (motilidade em massa, motilidade individual, vitalidade, morfologia e concentração). Apesar de fornecerem informações relevantes, esses parâmetros não predizem a fertilidade com precisão, de modo que a gestação continua sendo o teste confirmatório da capacidade reprodutiva (Wallach; Blasco, 1984). Dentre os atributos avaliados, a motilidade destaca-se como uma característica associada ao ejaculado fértil e considerada um indicador da função espermática (Stornelli; Sota, 2006), apresentando correlação positiva com a taxa de fertilização (Gillan et al., 2008; Kathiravan et al., 2008).

Inicialmente, a motilidade espermática era avaliada de forma subjetiva, por observação direta de técnicos treinados com microscópio de contraste de fase (Dott; Foster, 1979; Katz; Dott, 1975). Apesar de simples e rápido, esse método apresenta alta variabilidades e imprecisão, o que limita sua aplicação na predição da fertilidade (Muiño; Fernández; Peña, 2006). Buscando maior objetividade, foi desenvolvido o sistema computorizado de análise seminal (*Computer Assisted Sperm Analyzer* – CASA), capaz de medir quantitativamente as características cinemáticas dos espermatozoides (Amann; Katz, 2004). O *software* identifica as células no campo escuro, registra seus movimentos em sequência e calcula parâmetros relacionados ao deslocamento (Mortimer, 2000).

Além de aumentar a precisão das análises, o CASA possibilita a identificação de subpopulações espermáticas, que representam grupos de células com perfis cinemáticos

distintos. As subpopulações são definidas por abordagens estatísticas ou por limiares de velocidade e linearidade, variando a quantidade de subpopulações entre espécies e raças (Ibanescu; Siuda; Bollwein, 2020). As características das subpopulações já foram associadas tanto à fertilidade (De Paz et al., 2011; Ramón et al., 2013) quanto à criotolerância (Ortega-Ferrusola et al., 2009). Para simplificar a interpretação dos resultados, diferentes modelos estatísticos foram propostos, em humanos (Davis; Drobnis; Overstreet, 1995) e cães (Martínez; Morán; Peña, 2006), simplificando os resultados do CASA em apenas dois parâmetros. Esses modelos buscam facilitar a interpretação e o uso dos dados obtidos. Em bovinos, os parâmetros obtidos por meio do CASA têm sido relacionados ao potencial de fertilidade (Tanghe et al., 2002; Nagy et al., 2015; Li et al., 2016), evidenciando as possibilidades dessa ferramenta na análise seminal.

Apesar dos avanços recentes na análise seminal assistida por computador, ainda não há estudos que estabeleçam índices espermáticos em bovinos baseados nos parâmetros obtidos por CASA utilizando ferramentas estatísticas multivariadas, como a análise de componentes principais (PCA). De forma semelhante, o conhecimento sobre a correlação entre subpopulações espermática e o proteoma permanece limitado. Embora diversas pesquisas tenham buscado identificar biomarcadores associados à fertilidade e à resistência à criopreservação por meio de abordagens ômicas, não há estudos que integram essas ferramentas com a avaliação de subpopulações espermáticas. Nesse contexto, o presente estudo propõe investigar de forma integrada as características cinemáticas, a estrutura de subpopulações e o proteoma espermático, visando aprofundar a compreensão dos mecanismos funcionais dos espermatozoides bovinos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Célula espermática

Os espermatozoides são os gametas masculinos e representam a fração sólida do sêmen. Trata-se de células haploides especializadas, produzidas nos túbulos seminíferos testiculares a partir das espermatogônias, em um processo conhecido como espermatogênese (Amann, 1981). As células passam por uma série de transformações estruturais desde sua síntese nos túbulos seminíferos até sua chegada à cauda do epidídimo, onde adquirem maturidade funcional. A duração desse processo varia entre as espécies e, em bovinos, tem duração de aproximadamente 60 dias (Amann, 1981; Staub; Johnson, 2018).

Morfologicamente, a célula espermática madura é alongada e composta por dois

References

Agarwal, A., Bertolla, R.P., Samanta, L., 2016. Sperm proteomics: potential impact on male infertility treatment. Expert Rev. Proteomics. 13, 285–296. https://doi.org/10.1586/14789450.2016.1151357

Agarwal, A., Sharma, R.K., Nelson, D.R., 2003. New semen quality scores developed by principal component analysis of semen characteristics. J. Androl. 24, 343–352. https://doi.org/10.1002/j.1939-4640.2003.tb02681.x

Alshawa, E., Laqqan, M., Montenarh, M., Hammadeh, M.E., 2019. Influence of cryopreservation on the CATSPER2 and TEKT2 expression levels and protein levels in human spermatozoa. Toxicol. Rep. 6, 819–824. https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2019.08.004

Amann, R.P., Waberski, D., 2014. Computer-assisted sperm analysis (CASA): Capabilities and potential developments. Theriogenology. 81, 5-17.e3. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.09.004

Amaral, A., 2022. Energy metabolism in mammalian sperm motility. WIREs Mech. Dis. 14, e1569. https://doi.org/10.1002/wsbm.1569

Amaral, A., Paiva, C., Attardo Parrinello, C., Estanyol, J.M., Ballescà, J.L., Ramalho-Santos, J., Oliva, R., 2014. Identification of Proteins Involved in Human Sperm Motility Using High-Throughput Differential Proteomics. J. Proteome Res. 13, 5670–5684. https://doi.org/10.1021/pr500652y

Cao, H., Wan, Z., Wang, F., Liu, Z., Li, X., Hou, J., 2021. Downregulation of KIF2C and TEKT2 is associated with male infertility and testicular carcinoma. Aging 13, 22898–22911. https://doi.org/10.18632/aging.203583

Carvalho, M.G., Silva, K.M., Aristizabal, V.H.V., Ortiz, P.E.O., Paranzini, C.S., Melchert, A., Amaro, J.L., Souza, F.F., 2021. Effects of obesity and diabetes on sperm cell proteomics in rats. J. Proteome Res. 20, 2628–2642. https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.0c01044

Chen, X., Li, Z., Lv, Y., Han, Y., Qu, X., Zhang, Y., Jin, Y., 2022. Comparative proteomic identification of capacitated and non-capacitated sperm of Yanbian Yellow Cattle. Theriogenology 186, 12–20. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2022.03.026

Corbet, N.J., Burns, B.M., Johnston, D.J., Wolcott, M.L., Corbet, D.H., Venus, B.K., Li, Y., McGowan, M.R., Holroyd, R.G., 2012. Male traits and herd reproductive capability in tropical beef cattle. 2. Genetic parameters of bull traits. Anim. Prod. Sci. 53, 101–113. https://doi.org/10.1071/AN12163

Correia, J., Michelangeli, F., Publicover, S., 2015. Regulation and roles of Ca2+ stores in human sperm. Reproduction 150, R65–R76. https://doi.org/10.1530/REP-15-0102

D'Amours, O., Calvo, É., Bourassa, S., Vincent, P., Blondin, P., Sullivan, R., 2019. Proteomic markers of low and high fertility bovine spermatozoa separated by Percoll gradient. Mol. Reprod. Dev. 86, 999–1012. https://doi.org/10.1002/mrd.23174

Davis, R.O., Drobnis, E.Z., Overstreet, J.W., 1995. Application of multivariate cluster, discriminate function, and stepwise regression analyses to variable selection and predictive modeling of sperm cryosurvival. Fertil. Steril. 63, 1051–1057. https://doi.org/10.1016/S0015-0282(16)57547-5

Diether, N., Dyck, M.K., 2017. Male fertility evaluation using biomarkers in livestock. JSM Biomark. 3, 1–7. https://doi.org/10.47739/1011

Dordas-Perpinyà, M., Sergeant, N., Ruelle, I., Bruyas, J.-F., Charreaux, F., Michaud, S., Carracedo, S., Catalán, J., Miró, J., Delehedde, M., Briand-Amirat, L., 2022. ProAKAP4 semen concentrations as a valuable marker protein of post-thawed semen quality and bull fertility: A retrospective study. Vet. Sci. 9, 224. https://doi.org/10.3390/vetsci9050224

Du, C., Han, Y.-L., Hou, C.-C., Zhu, J.-Q., 2019. Expression pattern of heat shock protein 90AB (HSP90AB) and stress-inducible protein 1 (Stip1) during spermatogenesis of mudskipper Boleophthalmus pectinirostris. Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol. 231, 42–51. https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2019.01.016

Ewald, J.D., Zhou, G., Lu, Y., Kolic, J., Ellis, C., Johnson, J.D., Macdonald, P.E., Xia, J., 2024. Web-based multi-omics integration using the Analyst software suite. Nat. Protoc. 19, 1467–1497. https://doi.org/10.1038/s41596-023-00950-4

Ferraz, M.A.M.M., Morató, R., Yeste, M., Arcarons, N., Pena, A.I., Tamargo, C., Hidalgo, C.O., Muiño, R., Mogas, T., 2014. Evaluation of sperm subpopulation structure in relation to in vitro sperm–oocyte interaction of frozen-thawed semen from Holstein bulls. Theriogenology. 81, 1067–1072. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.01.033

Flores, E., Fernández-Novell, J.M., Peña, A., Rodríguez-Gil, J.E., 2009. The degree of resistance to freezing-thawing is related to specific changes in the structures of motile sperm subpopulations and mitochondrial activity in boar spermatozoa. Theriogenology. 72, 784–797. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2009.05.013

Greenacre, M., Groenen, P.J.F., Hastie, T., D'Enza, A.I., Markos, A., Tuzhilina, E., 2022. Principal component analysis. Nat. Rev. Methods Primer. 2, 100.

https://doi.org/10.1038/s43586-022-00184-w

Hashemitabar, M., Sabbagh, S., Orazizadeh, M., Ghadiri, A., Bahmanzadeh, M., 2015. A proteomic analysis on human sperm tail: comparison between normozoospermia and asthenozoospermia. J. Assist. Reprod. Genet. 32, 853–863. https://doi.org/10.1007/s10815-015-0465-7

He, L., Diedrich, J., Chu, Y.-Y., Yates, J.R.I., 2015. Extracting accurate precursor information for tandem mass spectra by rawconverter. Anal. Chem. 87, 11361–11367. https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b02721

He, X., Liu, C., Yang, X., Lv, M., Ni, X., Li, Q., Cheng, H., Liu, W., Tian, S., Wu, H., Gao, Y., Yang, C., Tan, Q., Cong, J., Tang, D., Zhang, J., Song, B., Zhong, Y., Li, H., Zhi, W., Mao, X., Fu, F., Ge, L., Shen, Q., Zhang, M., Saiyin, H., Jin, L., Xu, Y., Zhou, P., Wei, Z., Zhang, F., Cao, Y., 2020. Bi-allelic loss-of-function variants in CFAP58 cause flagellar axoneme and mitochondrial sheath defects and asthenoteratozoospermia in humans and mice. Am. J. Hum. Genet. 107, 514–526. https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2020.07.010

Hidalgo, M.M.T., Almeida, A.B.M. de, Moraes, F.L.Z. de, Marubayashi, R.Y.P., Souza, F.F. de, Barreiros, T.R.R., Martins, M.I.M., 2021. Sperm subpopulations influence the pregnancy rates in cattle. Reprod. Domest. Anim. 56, 1117–1127. https://doi.org/10.1111/rda.13955

Hofherr, A., Seger, C., Fitzpatrick, F., Busch, T., Michel, E., Luan, J., Osterried, L., Linden, F., Kramer-Zucker, A., Wakimoto, B., Schütze, C., Wiedemann, N., Artati, A., Adamski, J., Walz, G., Kunji, E.R.S., Montell, C., Watnick, T., Köttgen, M., 2018. The mitochondrial transporter SLC25A25 links ciliary TRPP2 signaling and cellular metabolism. PLOS Biol. 16, e2005651. https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2005651

Huang, S.Y., Kuo, Y.H., Tsou, H.L., Lee, Y.P., King, Y.T., Huang, H.C., Yang, P.C., Lee, W.C., 2000. The decline of porcine sperm motility by geldanamycin, a specific inhibitor of heat-shock protein 90 (HSP90). Theriogenology. 53, 1177–1184. https://doi.org/10.1016/S0093-691X(00)00262-4

Ibanescu, I., Siuda, M., Bollwein, H., 2020. Motile sperm subpopulations in bull semen using different clustering approaches – Associations with flow cytometric sperm characteristics and fertility. Anim. Reprod. Sci. 215, 106329. https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2020.106329

Jahangiri, S., Abdan, Z., Totonchi, M., Allahmoradi, F., Mousavi, S.A., Aznab, M.,

Kobraei, M., Padidar, K., 2025. Missense genetic variant in IQCA1 gene in patients with meningioma. Acta Neurol. Belg. 125, 1251–1259. https://doi.org/10.1007/s13760-025-02760-9

Jessop, M., Felix, J., Gutsche, I., 2021. AAA+ ATPases: structural insertions under the magnifying glass. Curr. Opin. Struct. Biol., Centrosomal Organization and Assemblies ● Folding and Binding 66, 119–128. https://doi.org/10.1016/j.sbi.2020.10.027

Jiang, D., Zhao, L., Clapham, D.E., 2009. Genome-Wide RNAi Screen Identifies Letm1 as a Mitochondrial Ca2+/H+ Antiporter. Science. https://doi.org/10.1126/science.1175145

Kadirvel, G., Periasamy, S., Kumar, S., 2012. Effect of Cryopreservation on Apoptotic-like Events and its Relationship with Cryocapacitation of Buffalo (Bubalus bubalis) Sperm. Reprod. Domest. Anim. 47, 143–150. https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2011.01818.x

Kampinga, H.H., Craig, E.A., 2010. The HSP70 chaperone machinery: J proteins as drivers of functional specificity. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 11, 579–592. https://doi.org/10.1038/nrm2941

Kanno, C., Sakamoto, K.Q., Kang, S.-S., Yanagawa, Y., Katagiri, S., Nagano, M., 2023. The Difference in Subpopulation Structures in Sex-Sorted and Non-Sorted Semen by Discriminant Analysis of Bull Sperm Motility Data Collected by a Computer-Assisted Sperm Analysis System. Andrologia 2023, e9944344. https://doi.org/10.1155/2023/9944344

Kasimanickam, R.K., Kasimanickam, V.R., Arangasamy, A., Kastelic, J.P., 2019. Sperm and seminal plasma proteomics of high- versus low-fertility Holstein bulls. Theriogenology. 126, 41–48. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2018.11.032

Kathiravan, P., Kalatharan, J., Karthikeya, G., Rengarajan, K., Kadirvel, G., 2011. Objective sperm motion analysis to assess dairy bull fertility using computer-aided system – a review. Reprod. Domest. Anim. 46, 165–172. https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2010.01603.x

Katz, D.F., Davis, R.O., Delandmeter, B.A., Overstreet, J.W., 1985. Real-time analysis of sperm motion using automatic video image digitization. Comput. Methods Programs Biomed. 21, 173–182. https://doi.org/10.1016/0169-2607(85)90002-1

Katz, D.F., Yanagimachi, R., 1980. Movement Characteristics of Hamster Spermatozoa Within the Oviduct. Biol. Reprod. 22, 759–764.

https://doi.org/10.1095/biolreprod22.4.759

Linke, V., Chodkowski, M., Kaszuba, K., Radkiewicz, M., Schrader, T.A., Das, H., Rana, V., Stadnik, D., Dadlez, M., Warscheid, B., Schrader, M., Chacinska, A., 2025. Integrated proteome and lipidome analyses place OCIAD1 at the mitochondria–peroxisome intersection balancing lipid metabolism. J. Cell Sci. 138, jcs263729. https://doi.org/10.1242/jcs.263729

Luo, S., Wehr, N.B., Levine, R.L., 2006. Quantitation of protein on gels and blots by infrared fluorescence of Coomassie blue and Fast Green. Anal. Biochem. 350, 233–238. https://doi.org/10.1016/j.ab.2005.10.048

Martin, G., Sabido, O., Durand, P., Levy, R., 2004. Cryopreservation Induces an Apoptosis-Like Mechanism in Bull Sperm. Biol. Reprod. 71, 28–37. https://doi.org/10.1095/biolreprod.103.024281

Martínez, I.N., Morán, J.M., Peña, F.J., 2006. Two-Step cluster procedure after principal component analysis identifies sperm subpopulations in canine ejaculates and iIts relation to cryoresistance. J. Androl. 27, 596–603. https://doi.org/10.2164/jandrol.05153

Martínez-Pastor, F., 2022. What is the importance of sperm subpopulations? Anim. Reprod. Sci. 246, 106844. https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2021.106844

Morrell, J.M., Nongbua, T., Valeanu, S., Lima Verde, I., Lundstedt-Enkel, K., Edman, A., Johannisson, A., 2017. Sperm quality variables as indicators of bull fertility may be breed dependent. Anim. Reprod. Sci. 185, 42–52. https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2017.08.001

Mortimer, S., 1997. A critical review of the physiological importance and analysis of sperm movement in mammals. Hum. Reprod. Update 3, 403–439. https://doi.org/10.1093/humupd/3.5.403

Mortimer, S.T., 2000. CASA—practical aspects. J. Androl. 21, 515–524. https://doi.org/10.1002/j.1939-4640.2000.tb02116.x

Muhammad Aslam, M.K., Sharma, V.K., Pandey, S., Kumaresan, A., Srinivasan, A., Datta, T.K., Mohanty, T.K., Yadav, S., 2018. Identification of biomarker candidates for fertility in spermatozoa of crossbred bulls through comparative proteomics. Theriogenology. 119, 43–51. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2018.06.021

Muiño, R., Tamargo, C., Hidalgo, C.O., Peña, A.I., 2008. Identification of sperm subpopulations with defined motility characteristics in ejaculates from Holstein bulls: Effects of cryopreservation and between-bull variation. Anim. Reprod. Sci.

109, 27–39. https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2007.10.007

Neuhoff, V., Arold, N., Taube, D., Ehrhardt, W., 1988. Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. Electrophoresis. 9, 255–262. https://doi.org/10.1002/elps.1150090603

Nowakowska, M., Gualtieri, F., von Rüden, E.-L., Hansmann, F., Baumgärtner, W., Tipold, A., Potschka, H., 2020. Profiling the Expression of Endoplasmic Reticulum Stress Associated Heat Shock Proteins in Animal Epilepsy Models. Neuroscience 429, 156–172. https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2019.12.015

Núñez-Martínez, I., Moran, J., Peña, F., 2006. A three-step statistical procedure to identify sperm kinematic subpopulations in canine ejaculates: changes after cryopreservation. Reprod. Domest. Anim. 41, 408–415. https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2006.00685.x

Oliveira, B.M., Arruda, R.P., Thomé, H.E., Maturana Filho, M., Oliveira, G., Guimarães, C., Nichi, M., Silva, L.A., Celeghini, E.C.C., 2014. Fertility and uterine hemodynamic in cows after artificial insemination with semen assessed by fluorescent probes. Theriogenology 82, 767–772. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.06.007

Pardede, B.P., Kusumawati, A., Pangestu, M., Purwantara, B., 2023. Bovine sperm HSP-70 molecules: a potential cryo-tolerance marker associated with semen quality and fertility rate. Front. Vet. Sci. 10. https://doi.org/10.3389/fvets.2023.1167594

Park, Y.-J., Kwon, W.-S., Oh, S.-A., Pang, M.-G., 2012. Fertility-related proteomic profiling bull spermatozoa separated by percoll. J. Proteome Res. 11, 4162–4168. https://doi.org/10.1021/pr300248s

Parodi, J., 2014. Motility, viability, and calcium in the sperm cells. Syst. Biol. Reprod. Med. 60, 65–71. https://doi.org/10.3109/19396368.2013.869273

Peres Campanholi, S., Garcia Neto, S., Basso, A.C., de Agostini Losano, J.D., Perez Siqueira, A.F., Nichi, M., Ortiz D'Avila Assumpção, M.E., Afonso de Freitas, L., Paro de Paz, C.C., Ferraudo, A.S., Morato Monteiro, F., Unno Gimenes, L., 2021. Estimate of in vitro embryo production based on sperm subpopulations in Senepol bulls. Theriogenology. 161, 98–107. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.11.019

Quirós, P.M., Langer, T., López-Otín, C., 2015. New roles for mitochondrial proteases in health, ageing and disease. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 16, 345–359.

https://doi.org/10.1038/nrm3984

Rosenzweig, R., Nillegoda, N.B., Mayer, M.P., Bukau, B., 2019. The Hsp70 chaperone network. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 20, 665–680. https://doi.org/10.1038/s41580-019-0133-3

Sagare-Patil, V., Bhilawadikar, R., Galvankar, M., Zaveri, K., Hinduja, I., Modi, D., 2017. Progesterone requires heat shock protein 90 (HSP90) in human sperm to regulate motility and acrosome reaction. J. Assist. Reprod. Genet. 34, 495–503. https://doi.org/10.1007/s10815-017-0879-5

Saraf, K.K., Kumaresan, A., Arathi, B.P., Sundaresan, N.R., Datta, T.K., 2022. Comparative high-throughput analysis of sperm membrane proteins from crossbred bulls with contrasting fertility. Andrologia 54, e14451. https://doi.org/10.1111/and.14451

Schober, P., Vetter, T.R., 2021. Logistic Regression in Medical Research. Anesth. Analg. 132, 365. https://doi.org/10.1213/ANE.0000000000005247

Shao, J., Fu, Z., Ji, Y., Guan, X., Guo, S., Ding, Z., Yang, X., Cong, Y., Shen, Y., 2016. Leucine zipper-EF-hand containing transmembrane protein 1 (LETM1) forms a Ca2+/H+ antiporter. Sci. Rep. 6, 34174. https://doi.org/10.1038/srep34174

Silva, C.S., Vianna da Costa-e-Silva, E., Nunes Dode, M.A., Mendes Cunha, A.T., Garcia, W.R., Sampaio, B.F.B., Borges Silva, J.C., Vaz, F.E.M., Kerns, K., Sutovsky, P., Nogueira, E., 2023. Semen quality of Nellore and Angus bulls classified by fertility indices and relations with field fertility in fixed-time artificial insemination. Theriogenology. 212, 148–156. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2023.09.001

Tamai, S., Iida, H., Yokota, S., Sayano, T., Kiguchiya, S., Ishihara, N., Hayashi, J.-I., Mihara, K., Oka, T., 2008. Characterization of the mitochondrial protein LETM1, which maintains the mitochondrial tubular shapes and interacts with the AAA-ATPase BCS1L. J. Cell Sci. 121, 2588–2600. https://doi.org/10.1242/jcs.026625

Vahedi Raad, M., Firouzabadi, A.M., Tofighi Niaki, M., Henkel, R., Fesahat, F., 2024. The impact of mitochondrial impairments on sperm function and male fertility: a systematic review. Reprod. Biol. Endocrinol. 22, 83. https://doi.org/10.1186/s12958-024-01252-4

Waberski, D., Suarez, S.S., Henning, H., 2022. Assessment of sperm motility in livestock: Perspectives based on sperm swimming conditions in vivo. Anim. Reprod. Sci. 246, 106849. https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2021.106849

Wold, S., Sjöström, M., Eriksson, L., 2001. PLS-regression: a basic tool of chemometrics. Chemom. Intell. Lab. Syst., PLS Methods 58, 109–130. https://doi.org/10.1016/S0169-7439(01)00155-1

Yeste, M., Bonet, S., Rodríguez-Gil, J.E., Rivera Del Álamo, M.M., 2018. Evaluation of sperm motility with CASA-Mot: which factors may influence our measurements? Reprod. Fertil. Dev. 30, 789–798. https://doi.org/10.1071/RD17475

Yin, J., Liu, M., Wang, X., Miao, H., He, W., Liu, W., Yu, Z., Zhang, Q., Bai, J., Cheng, Y., Ni, B., 2025. Brief biology and pathophysiology of Tekt bundles. Cell Adhes. Migr. 19, 2465421. https://doi.org/10.1080/19336918.2025.2465421

Zhang, X.-G., Hu, S., Han, C., Zhu, Q.-C., Yan, G.-J., Hu, J.-H., 2015. Association of heat shock protein 90 with motility of post-thawed sperm in bulls. Cryobiology. 70, 164–169. https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2014.12.010