

RESSALVA

Atendendo solicitação da autora, o texto completo deste doutorado será disponibilizado somente a partir de 21/08/2027.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**RELAÇÃO ENTRE AS PROTEÍNAS MITOCONDRIAIS ESPERMÁTICAS E A
FERTILIDADE *IN VIVO* DE BOVINOS**

Relationship between sperm mitochondrial proteins and *in vivo* fertility in bovine

YASMIN EL HAYEK MARTINS

BOTUCATU
2025

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**RELAÇÃO ENTRE AS PROTEÍNAS MITOCONDRIAIS ESPERMÁTICAS E A
FERTILIDADE *IN VIVO* DE BOVINOS**

RELATIONSHIP BETWEEN SPERM MITOCHONDRIAL PROTEINS AND *IN VIVO*
FERTILITY IN BOVINE

Tese apresentada junto ao Programa de Pós-
graduação em Biotecnologia Animal para
obtenção do título de DOUTOR.
Yasmin El Hayek Martins

Orientadora: Profa. Dra. Fabiana Ferreira
de Souza

BOTUCATU
2025

H 417r	Hayek-Martins, Yasmin El Relação entre as proteínas mitocondriais espermáticas e a fertilidade in vivo de bovinos / Yasmin El Hayek-Martins. -- Botucatu, 2025 208 f. : il., tabs., fotos Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu Orientadora: Fabiana Ferreira de Souza 1. Mitocondria. 2. Reprodução animal. 3. Proteômica. 4. Bioenergética. 5. Bovinos. I. Título.
-----------	---

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

Nome do autor: Yasmin El Hayek Martins

Título: RELAÇÃO ENTRE AS PROTEÍNAS MITOCONDRIAIS ESPERMÁTICAS E A FERTILIDADE *IN VIVO* DE BOVINOS

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

Departamento de Cirurgia Veterinária e Reprodução Animal, FMVZ - UNESP - Botucatu/SP

Profa. Dr. Camila de Paula Freitas Dell’Aqua

Membro

Departamento de Cirurgia Veterinária e Reprodução Animal, FMVZ - UNESP - Botucatu/SP

Prof. Dr. André Maciel Crespilho

Membro

Universidade de Santo Amaro, UNISA, São Paulo/SP

Profa. Dr. Guilherme Rizzoto

Membro

Faculty of Veterinary Medicine, University of Bologna, Bologna, Italia

Data da defesa: 21 de agosto 2025.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha filha Nadya, minha maior inspiração e incentivo para realizar os sonhos da vida.

AGRADECIMENTOS

A Deus, sempre.

À minha filha Nadya, e ao meu marido Guilherme, pelo amor, incentivo, resiliência e paciência diante da minha ausência ao longo desse processo. Aos meus pais, Ibrahim e Cida, e às minhas irmãs Shadya, Dunya e Iman pelo amor e rede de apoio indispensável para chegar até aqui. À Hercy, por me mostrar que sempre é possível.

Ao querido professor Dr. André Crespilho, pela prontidão, alegria e confiança em abrir portas.

À minha orientadora, professora Dra. Fabiana Ferreira de Souza, pelo crescimento pessoal e profissional proporcionado, por tornar o complicado simples e sempre com coragem. Obrigada.

Aos professores Dr. Jacob Thundathil e Dr. John Kastelic pelo acolhimento e dedicação durante período sandwich.

Aos amigos da vida, de Calgary e da pós-graduação. Aos parceiros de laboratório que se tornaram grandes amigos: Saurabh e Paulina. E a todos os outros que me ensinaram ao longo dessa trajetória, foram muitos aprendizados.

A todos os professores e funcionários do Departamento de Reprodução Animal da FMVZ UNESP-Botucatu pela prontidão em ajudar.

À Central Bela Vista (CRV® Group) e à Agropecuária Ribeirópolis pela doação das amostras utilizadas no estudo. Ao Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM, Campinas, SP), LAPROT (FMVZ UNESP- Botucatu, SP) e ao Department of Production and Animal Health from University of Calgary (Calgary, AB, Canadá) pelo fornecimento das instalações necessárias para a realização do experimento.

Agradeço também ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e tecnológico (CNPq) pelo suporte financeiro (200922/2022-0) e ao apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Brasil.

*“Voando sem instrumentos
Ao sabor do vento
Se depender de mim, eu vou até o fim”.*
(Humberto Gessinger)

RESUMO

HAYEK-MARTINS, Y.E. **RELAÇÃO ENTRE AS PROTEÍNAS MITOCONDRIAIS ESPERMÁTICAS E A FERTILIDADE *IN VIVO* DE BOVINOS**.2025. 208p. Tese (Doutorado) em Biotecnologia Animal – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus Botucatu, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Botucatu –SP, 2025.

Mitocôndrias desempenham papel central na fisiologia espermática, sustentando a motilidade flagelar pela produção de ATP, regulando o balanço redox e assegurando a integridade celular. Dois estudos complementares foram conduzidos com o objetivo de aprofundar o conhecimento sobre o proteoma mitocondrial de espermatozoides bovinos e sua associação com a fertilidade. No primeiro estudo, caracterizou-se o proteoma mitocondrial a partir da aplicação de um protocolo otimizado de isolamento por centrifugação diferencial em tampão de sacarose, utilizando sêmen comercial congelado de 11 touros Nelore. Análises por microscopia eletrônica de transmissão e espectrometria de massas (LC-MS/MS) foram realizadas. Um total de 776 proteínas foram identificadas nos *pellets* mitocondriais e frações sobrenadantes, incluindo 213 com anotação mitocondrial, relacionadas a vias centrais como OXPHOS, ciclo do ácido tricarboxílico (TCA), glicólise/gliconeogênese, β -oxidação e metabolismo de aminoácidos de cadeia ramificada, além da detecção de 10 proteínas mitocondriais não previamente descritas em espermatozoides bovinos. A presença de proteínas mitocondriais nas frações sobrenadantes evidenciou limitações metodológicas e a complexidade estrutural da interface entre mitocôndrias e o citoesqueleto flagelar. No segundo estudo, os mesmos touros foram agrupados de acordo com taxas de prenhez obtidas por inseminação artificial em tempo fixo (IATF), sendo cinco de alta fertilidade (HF) e seis de baixa fertilidade (LF), totalizando 8.286 vacas inseminadas. A qualidade do sêmen foi avaliada por análise computadorizada (CASA), integridade de membrana, potencial mitocondrial e indicadores de estresse oxidativo. A análise proteômica, aliada a métodos multivariados, ontologia gênica, enriquecimento KEGG e correlação de Spearman com parâmetros espermáticos, identificou 495 proteínas, das quais 25 apresentaram abundância diferencial entre os grupos. Touros HF apresentaram maior abundância de proteínas associadas à arquitetura das cristas mitocondriais e ao transporte redox, sugerindo um sistema bioenergético mais eficiente e regulado. Por outro lado, touros LF exibiram maior abundância de proteínas envolvidas na importação de precursores nucleares, subunidades do complexo I e componentes do proteassoma, indicando estresse mitocondrial e prejuízo na proteostase. Os achados ampliam o conhecimento sobre a produção bioenergética espermática, revelam a plasticidade metabólica das mitocôndrias e identificam assinaturas moleculares associadas à fertilidade *in vivo*, oferecendo novas perspectivas para a compreensão da biologia espermática bovina e a seleção de reprodutores com maior eficiência reprodutiva.

Palavras chaves: mitocôndria, centrifugação diferencial, proteoma, bioenergética, bovinos.

ABSTRACT

HAYEK-MARTINS, Y.E. **RELATIONSHIP BETWEEN SPERM MITOCHONDRIAL PROTEINS AND *IN VIVO* FERTILITY IN BOVINE. 2025.** 208p. Tesis (Ph.D.) in Animal Biotechnology– School of Veterinary Medicine and Animal Science, Botucatu Campus, São Paulo State University. Botucatu – SP. 2025.

Mitochondria play a central role in sperm physiology by sustaining flagellar motility through ATP production, regulating redox balance, and maintaining cellular integrity. Two complementary studies were conducted to deepen our understanding of the mitochondrial proteome in bovine spermatozoa and its association with fertility. In the first study, the mitochondrial proteome was characterized using an optimized isolation protocol based on differential centrifugation in sucrose buffer, applied to commercially frozen semen samples from 11 Nelore bulls. Transmission electron microscopy (TEM) and high-resolution mass spectrometry (LC-MS/MS) were employed. A total of 776 proteins were identified across mitochondrial pellets and supernatant fractions, including 213 with mitochondrial annotation, related to core metabolic pathways such as OXPHOS, the tricarboxylic acid (TCA) cycle, glycolysis/gluconeogenesis, β -oxidation, and branched-chain amino acid metabolism. Notably, 10 mitochondrial proteins had not been previously reported in bovine sperm. The detection of mitochondrial proteins in the supernatant fractions highlighted methodological limitations and the structural complexity of the interface between mitochondria and the flagellar cytoskeleton. In the second study, the same bulls were categorized according to pregnancy rates obtained via fixed-time artificial insemination (FTAI), with five classified as high fertility (HF) and six as low fertility (LF), totaling 8,286 inseminated cows. Semen quality was assessed through computer-assisted sperm analysis (CASA), membrane integrity, mitochondrial membrane potential, and oxidative stress indicators. Proteomic analysis, combined with multivariate statistics, gene ontology enrichment, KEGG pathway analysis, and Spearman correlation with sperm parameters, identified 495 proteins, of which 25 showed differential abundance between groups. HF bulls exhibited increased levels of proteins involved in mitochondrial cristae organization and redox transport, suggesting a more efficient and tightly regulated bioenergetic system. Conversely, LF bulls showed higher abundance of proteins related to the import of nuclear-encoded precursors, Complex I subunits, and proteasome components, findings consistent with mitochondrial stress and impaired proteostasis. These results expand our understanding of sperm bioenergetics, highlight the metabolic plasticity of bovine mitochondria, and reveal molecular signatures associated with *in vivo* fertility, offering new insights for the selection of more reproductively efficient sires.

Keywords: mitochondria; differential centrifugation; proteome; bioenergetics; cattle.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	2
1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....	3
2. REVISÃO DE LITERATURA	5
2.1 O Sêmen e a fertilidade bovina	5
2.2 O espermatozoide bovino	6
2.3 Mitocôndrias em espermatozoides.....	8
2.4 Bioenergética dos espermatozoides	10
2.5 Atividade mitocondrial e biomarcadores funcionais da fertilidade espermática 11	
2.6 Métodos de isolamento mitocondrial.....	13
3. Hipótese	16
4. OBJETIVOS.....	16
5. REFERÊNCIAS.....	18
CAPÍTULO 2	23
ARTIGO CIENTÍFICO I.....	24
Abstract	25
Main 27	
Results	29
Discussion.....	42
References	52
Methods	59
References	65
Acknowledgements.....	66
Funding	66
Competing interests.....	66
CAPÍTULO 3	67

ARTIGO CIENTÍFICO II	68
Abstract	69
Introduction	70
Materials and methods.....	71
Results	78
Seminal characteristics	78
Discussion	102
Declaration of interest.....	108
Funding	108
Competing interests.....	108
Acknowledgements.....	109
References	109

CAPÍTULO 1

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

A fertilidade de touros é um fator determinante na eficiência dos programas reprodutivos em sistemas de produção bovina. O diagnóstico precoce e acurado da fertilidade dos animais é fundamental para a seleção de reprodutores com alto desempenho reprodutivo (Kastelic, 2013). Embora os métodos tradicionais de avaliação seminal, como a análise da motilidade, morfologia e integridade das membranas, sejam amplamente utilizados, a sua capacidade de prever a fertilidade *in vivo* ainda é limitada (Crespilho et al., 2017; Tanga et al., 2021; Gallo et al., 2021). Mesmo touros com características seminais dentro dos parâmetros considerados fisiológicos podem apresentar taxas de concepção inferiores, evidenciando que tais métodos não refletem aspectos moleculares e funcionais mais complexos sobre a capacidade fecundante dos espermatozoides (Thundathil et al., 2016; Madeja et al., 2021).

Nesse contexto, as mitocôndrias têm papel central na fisiologia espermática. Essas organelas estão localizadas na peça intermediária do flagelo, são responsáveis pelo suprimento de energia necessário à motilidade e outras funções celulares como capacitação, hiperativação e reação do acrossomo (Varuzhanyan, Chan, 2020; Durairajanayagam et al., 2021). Alterações estruturais e funcionais nas mitocôndrias, bem como falhas no seu genoma, proteoma e bioenergética, têm sido associadas à astenozoospermia e à subfertilidade em diversas espécies (Oliva et al., 2009; Amaral et al., 2013; Gaitskell-Phillips et al., 2021; Losano, Daigneault, 2023).

Frente à complexidade do sistema reprodutivo e às limitações das análises convencionais, abordagens baseadas na proteômica surgem como alternativas promissoras para a identificação de biomarcadores relacionados à fertilidade de touros (Gacem et al., 2023; Bustamante-Filho et al., 2022). A aplicação de técnicas como a espectrometria de massas, aliada à separação subcelular aplicada no sêmen pode permitir uma visão mais precisa dos mecanismos moleculares envolvidos na funcionalidade espermática (Amaral et al., 2014; Gacem et al., 2023). Ainda assim, são escassos os estudos que correlacionam esses perfis proteicos com dados objetivos de fertilidade *in vivo*, como as taxas de prenhez em programas de inseminação artificial em tempo fixo (IATF), a maioria concentra-se na análise do sêmen total sem considerar a contribuição específica de compartimentos celulares ou de frações isoladas.

Diante dessas lacunas, a investigação dos componentes proteicos presentes nas mitocôndrias espermáticas de touros com diferentes níveis de fertilidade representa uma oportunidade para ampliar o conhecimento sobre os determinantes moleculares da fertilidade em touros, suas aplicações nas biotecnologias reprodutivas, e para o desenvolvimento de ferramentas mais precisas de avaliação da fertilidade animal, impactando positivamente a eficiência dos programas de reprodução assistida, a produtividade e sustentabilidade dos sistemas pecuários.

- 776 Binsila BK, Archana SS, Ramya L, *et al.* 2021. Elucidating the processes and pathways
777 enriched in buffalo sperm proteome in regulating semen quality. *Cell Tissue Res* **383**,
778 881–903. (<https://doi.org/10.1007/s00441-020-03303-9>)
- 779 Blanco-Fernandez J, Jourdain AA 2023. Two-step tag-free isolation of mitochondria for
780 improved protein discovery and quantification. *J Vis Exp JoVE*.
781 (<https://doi.org/10.3791/65252>)
- 782 Bohnert M, Zerbes RM, Davies KM, *et al.* 2015. Central role of Mic10 in the
783 mitochondrial contact site and cristae organizing system. *Cell Metab* **21**, 747–755.
784 (<https://doi.org/10.1016/j.cmet.2015.04.007>)
- 785 Boura E, Nencka R 2015. Phosphatidylinositol 4-kinases: Function, structure, and
786 inhibition. *Exp Cell Res* **337**, 136–145. (<https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2015.03.028>)
- 787 Bustamante-Filho IC, Pasini M, Moura AA 2022. Spermatozoa and seminal plasma
788 proteomics: Too many molecules, too few markers. The case of bovine and porcine
789 semen. *Anim Reprod Sci* **247**, 107075.
790 (<https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2022.107075>)
- 791 Carnielli CM, Macedo CCS, De Rossi T, *et al.* 2018. Combining discovery and targeted
792 proteomics reveals a prognostic signature in oral cancer. *Nat Commun* **9**, 3598.
793 (<https://doi.org/10.1038/s41467-018-05696-2>)
- 794 Chauvigné F, Boj M, Finn RN, *et al.* 2015. Mitochondrial aquaporin-8-mediated
795 hydrogen peroxide transport is essential for teleost spermatozoon motility. *Sci Rep* **5**,
796 7789. (<https://doi.org/10.1038/srep07789>)
- 797 Checa A, Bedia C, Jaumot J 2015. Lipidomic data analysis: tutorial, practical guidelines
798 and applications. *Anal Chim Acta* **885**, 1–16. (<https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.02.068>)
- 799 Chi Z, Chen S, Xu T, *et al.* 2020. Histone deacetylase 3 couples mitochondria to drive
800 IL-1 β -dependent inflammation by configuring fatty acid oxidation. *Mol Cell* **80**, 43-
801 58.e7. (<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2020.08.015>)
- 802 Córdoba M, Pintos L, Beconi MT 2005. Differential activities of malate and isocitrate
803 NAD(P)-dependent dehydrogenases are involved in the induction of capacitation and
804 acrosome reaction in cryopreserved bovine spermatozoa. *Andrology* **37**(1) 40-46.
805 (<https://doi.org/10.1111/j.1439-0272.2004.00650.x>)
- 806 Crespilho AM, Chiaradia L, Cortez A, *et al.* 2017. Avaliação da sensibilidade da técnica
807 computadorizada de análise (CASA) para a determinação da concentração espermática
808 do sêmen bovino congelado. *Braz J Vet Res Anim Sci* **54**, 247–252.
809 (<https://doi.org/10.11606/issn.1678-4456.bjvras.2017.127773>)
- 810 D'Amours O, Calvo É, Bourassa S, *et al.* 2019. Proteomic markers of low and high
811 fertility bovine spermatozoa separated by Percoll gradient. *Mol Reprod Dev* **86**, 999–
812 (1012. <https://doi.org/10.1002/mrd.23174>)
- 813 Dell'Aqua C de PF, Guasti PN, Monteiro GA, *et al.* 2012. Flow cytometric analysis of
814 fertile and subfertile frozen stallion spermatozoa. *Anim Reprod* **9** 941.

- 815 Etkovitz N, Rubinstein S, Daniel L, *et al.* 2007. Role of PI3-kinase and PI4-kinase in
816 actin polymerization during bovine sperm capacitation. *Biol Reprod* **77**, 263–273.
817 (<https://doi.org/10.1095/biolreprod.106.056705>)
- 818 Ewald JD, Zhou G, Lu Y, *et al.* 2024. Web-based multi-omics integration using the
819 Analyst software suite. *Nat Protoc* **19** 1467–1497. ([https://doi.org/10.1038/s41596-023-](https://doi.org/10.1038/s41596-023-00950-4)
820 00950-4)
- 821 Fernandez-Vizarra E, Zeviani M 2021. Mitochondrial disorders of the OXPHOS
822 system. *FEBS Lett* **595** 1062–1106. (<https://doi.org/10.1002/1873-3468.13995>)
- 823 Ferramosca A, Zara V 2017. Mitochondria and fertility: the mitochondria critical role
824 on spermatozoa function. (<https://doi.org/10.1285/i25327518v1i1p21>)
- 825 Florman H, Jungnickel M, Sutton K 2003. Enkurin and uses thereof.
826 AU2003216442A1.
- 827 Frezza C, Cipolat S, Scorrano L 2007. Organelle isolation: functional mitochondria
828 from mouse liver, muscle and cultured fibroblasts. *Nat Protoc* **2** 287–295.
829 (<https://doi.org/10.1038/nprot.2006.478>)
- 830 Friedman JR, Mourier A, Yamada J, *et al.* 2015. MICOS coordinates with respiratory
831 complexes and lipids to establish mitochondrial inner membrane architecture. *eLife* **4**
832 e07739. (<https://doi.org/10.7554/eLife.07739>)
- 833 Gacem S, Castello-Ruiz M, Hidalgo CO, *et al.* 2023. Bull sperm SWATH-MS-based
834 proteomics reveals link between high fertility and energy production, motility
835 structures, and sperm–oocyte interaction. *J Proteome Res* **22** 3607–3624.
836 (<https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.3c00461>)
- 837 Gaitskell-Phillips G, Martín-Cano FE, Ortiz-Rodríguez JM, *et al.* 2021. Proteins
838 involved in mitochondrial metabolic functions and fertilization predominate in stallions
839 with better motility. *J Proteomics* **247**, 104335.
840 (<https://doi.org/10.1016/j.jprot.2021.104335>)
- 841 Gallo A, Esposito MC, Tosti E, *et al.* 2021. Sperm motility, oxidative status, and
842 mitochondrial activity: Exploring correlation in different species. *Antioxid Basel Switz*
843 **10**, 1131. (<https://doi.org/10.3390/antiox10071131>)
- 844 Geyer CB, Inselman AL, Sunman JA, *et al.* 2009. A missense mutation in the Capza3
845 gene and disruption of F-actin organization in spermatids of repro32 infertile male mice.
846 *Dev Biol* **330** 142–152. (<https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2009.03.020>)
- 847 Grassi S, Bisconti M, Martinet B, *et al.* 2022. Targeted analysis of HSP70 isoforms in
848 human spermatozoa in the context of capacitation and motility. *Int J Mol Sci* **23** 6497.
849 (<https://doi.org/10.3390/ijms23126497>)
- 850 Guimarães DB, Barros TB, van Tilburg MF, *et al.* 2017. Sperm membrane proteins
851 associated with the boar semen cryopreservation. *Anim Reprod Sci* **183** 27–38.
852 (<https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2017.06.005>)

- 853 Hecht NB, Bradley FM 1981. Changes in mitochondrial protein composition during
854 testicular differentiation in mouse and bull. *Gamete Res* **4** 433–449.
855 (<https://doi.org/10.1002/mrd.1120040507>)
- 856 Hirst J 2013. Mitochondrial complex I. *Annu Rev Biochem* **82** 551–575.
857 (<https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-070511-103700>)
- 858 Jungnickel MK, Sutton KA, Baker MA, *et al.* 2018. The flagellar protein Enkurin is
859 required for mouse sperm motility and for transport through the female reproductive
860 tract. *Biol Reprod* **99** 789–797. (<https://doi.org/10.1093/biolre/ioy105>)
- 861 Kastelic JP 2013. Male involvement in fertility and factors affecting semen quality in
862 bulls. *Anim Front* **3** 20–25. (<https://doi.org/10.2527/af.2013-0029>)
- 863 Kerns K, Morales P, Sutovsky P 2016. Regulation of sperm capacitation by the 26S
864 proteasome: An emerging new paradigm in spermatology. *Biol Reprod* **94** 117.
865 (<https://doi.org/10.1095/biolreprod.115.136622>)
- 866 Kim J-D, Zhou T, Zhang A, *et al.* 2022. AIBP regulates metabolism of ketone and
867 lipids but not mitochondrial respiration. *Cells* **11** 3643.
868 (<https://doi.org/10.3390/cells11223643>)
- 869 Klecker T, Westermann B 2021. Pathways shaping the mitochondrial inner membrane.
870 *Open Biol* **11** 210238. (<https://doi.org/10.1098/rsob.210238>)
- 871 Losano JD de A, Daigneault BW 2023. Pharmacological perturbation of peroxisome-
872 proliferator-activated receptor gamma alters motility and mitochondrial function of
873 bovine sperm. *Andrology* **11** 155–166. (<https://doi.org/10.1111/andr.13308>)
- 874 Luo S, Wehr NB, Levine RL 2006. Quantitation of protein on gels and blots by infrared
875 fluorescence of Coomassie blue and Fast Green. *Anal Biochem* **350** 233–238.
876 (<https://doi.org/10.1016/j.ab.2005.10.048>)
- 877 Madeja ZE, Podralska M, Nadel A, *et al.* 2021. Mitochondria content and activity are
878 crucial parameters for bull sperm quality evaluation. *Antioxid Basel Switz* **10** 1204.
879 (<https://doi.org/10.3390/antiox10081204>)
- 880 Maylem ERS, Rivera SM, Ramos GE, *et al.* 2021. Changes on the heat shock protein 70
881 (HSP70) in water buffalo spermatozoa revealed the capacitation-like event in
882 cryopreservation. *Asian J Agric & Biol* **9** 202007412
883 (<https://doi.org/10.35495/ajab.2020.07.412>)
- 884 McLean DJ, Korn N, Perez BS, *et al.* 1993. Isolation and characterization of
885 mitochondria from turkey spermatozoa. *J Androl* **14** 433–438.
- 886 Müller T 2019. Role of MICOS for mitochondrial morphology and function (doctoral
887 thesis). (<https://doi.org/10.53846/goediss-7776>)
- 888 Neuhoﬀ V, Arold N, Taube D, *et al.* 1988. Improved staining of proteins in
889 polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at
890 nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis*
891 **9** 255–262. (<https://doi.org/10.1002/elps.1150090603>)

- 892 Nichi M, Goovaerts IGF, Cortada CNM, *et al.* 2007. Roles of lipid peroxidation and
893 cytoplasmic droplets on in vitro fertilization capacity of sperm collected from bovine
894 epididymides stored at 4 and 34 degrees C. *Theriogenology* **67** 334–340.
895 (<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2006.08.002>)
- 896 Nosková A, Hiltpold M, Janett F, *et al.* 2021. Infertility due to defective sperm flagella
897 caused by an intronic deletion in DNAH17 that perturbs splicing. *Genetics* **217** iyaa033.
898 (<https://doi.org/10.1093/genetics/iyaa033>)
- 899 Ou X, Yang J, Yang L, *et al.* 2025. Histone acetylation regulated by histone
900 deacetylases during spermatogenesis. *Andrology* **13** 706–717.
901 (<https://doi.org/10.1111/andr.13723>)
- 902 Palmieri F, Scarcia P, Monné M 2020. Diseases caused by mutations in mitochondrial
903 carrier genes SLC25: A review. *Biomolecules* **10** 655.
904 (<https://doi.org/10.3390/biom10040655>)
- 905 Panda AP, Roy SC, Sakhare DT, *et al.* 2019. Reduced cytochrome oxidase activity and
906 increased protein tyrosine phosphorylation of mitochondria-rich fractions of buffalo
907 (*Bubalus bubalis*) spermatozoa after a cycle of freezing and thawing. *Reprod Fertil Dev*
908 **31** 1567–1580. (<https://doi.org/10.1071/RD18502>)
- 909 Pardede BP, Karja NWK, Said S, *et al.* 2024. Bovine nucleoprotein transitions genes
910 and protein abundance as valuable markers of sperm motility and the correlation with
911 fertility. *Theriogenology* **215** 86–94.
912 (<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2023.11.015>)
- 913 Pardede BP, Kusumawati A, Pangestu M, *et al.* 2023. Bovine sperm HSP-70 molecules:
914 a potential cryo-tolerance marker associated with semen quality and fertility rate. *Front*
915 *Vet Sci* **10**. (<https://doi.org/10.3389/fvets.2023.1167594>)
- 916 Rath S, Sharma R, Gupta R, *et al.* 2021. MitoCarta3.0: An updated mitochondrial
917 proteome now with sub-organelle localization and pathway annotations. *Nucleic Acids*
918 *Res* **49** D1541–D1547. (<https://doi.org/10.1093/nar/gkaa1011>)
- 919 Ross JM, Olson L, Coppotelli G 2015. Mitochondrial and ubiquitin proteasome system
920 dysfunction in ageing and disease: two sides of the same coin? *Int J Mol Sci* **16** 19458–
921 19476. (<https://doi.org/10.3390/ijms160819458>)
- 922 Rosyada ZNA, Ulum MF, Tumbelaka LITA, *et al.* 2022. Implications of sperm heat
923 shock protein 70-2 in bull fertility. *Vet World* **15** 1456–1466.
924 (<https://doi.org/10.14202/vetworld.2022.1456-1466>)
- 925 Rotimi DE, Iyobhebhe M, Oluwayemi ET, *et al.* 2024. Energy metabolism and
926 spermatogenesis. *Heliyon* **10** e38591. (<https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e38591>)
- 927 Sellem E, Broekhuijse MLWJ, Chevrier L, *et al.* 2015. Use of combinations of in vitro
928 quality assessments to predict fertility of bovine semen. *Theriogenology* **84** 1447–
929 1454.e5. (<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.07.035>)

- 930 Shevchenko A, Wilm M, Vorm O, *et al.* 1996. Mass spectrometric sequencing of
 931 proteins from silver-stained polyacrylamide gels. *Anal Chem* **68** 850–858.
 932 (<https://doi.org/10.1021/ac950914h>)
- 933 Sung AY, Guerra RM, Steenberge LH, *et al.* 2024. Systematic analysis of NDUFAF6 in
 934 complex I assembly and mitochondrial disease. *Nat Metab* **6** 1128–1142.
 935 (<https://doi.org/10.1038/s42255-024-01039-2>)
- 936 Sutovsky P 2011. Sperm proteasome and fertilization. *Reprod Camb Engl* **142** 1–14.
 937 (<https://doi.org/10.1530/REP-11-0041>)
- 938 Sutton KA, Jungnickel MK, Wang Y, *et al.* 2004. Enkurin is a novel calmodulin and
 939 TRPC channel binding protein in sperm. *Dev Biol* **274** 426–435.
 940 (<https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2004.07.031>)
- 941 Tanga BM, Qamar AY, Raza S, *et al.* 2021. Semen evaluation: methodological
 942 advancements in sperm quality-specific fertility assessment — A review. *Anim Biosci*
 943 **34** 1253–1270. (<https://doi.org/10.5713/ab.21.0072>)
- 944 Thundathil JC, Dance AL, Kastelic JP 2016. Fertility management of bulls to improve
 945 beef cattle productivity. *Theriogenology* **86** 397–405.
 946 (<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.04.054>)
- 947 Thundathil JC, Rajamanickam GD, Kastelic JP 2018. Na/K-ATPase and regulation of
 948 sperm function. *Anim Reprod* **15** 711–720. (<https://doi.org/10.21451/1984-3143-AR2018-0024>)
- 950 Tomlinson M, Lewis S, Morroll D, *et al.* 2013. Sperm quality and its relationship to
 951 natural and assisted conception: British Fertility Society guidelines for practice. *Hum*
 952 *Fertil Camb Engl* **16** 175–193. (<https://doi.org/10.3109/14647273.2013.807522>)
- 953 Torra-Massana M, Jodar M, Barragán M, *et al.* 2021. Altered mitochondrial function in
 954 spermatozoa from patients with repetitive fertilization failure after ICSI revealed by
 955 proteomics. *Andrology* **9** 1192–1204. (<https://doi.org/10.1111/andr.12991>)
- 956 Tyanova S, Temu T, Sinitcyn P, *et al.* 2016. The Perseus computational platform for
 957 comprehensive analysis of (prote)omics data. *Nat Methods* **13** 731–740.
 958 (<https://doi.org/10.1038/nmeth.3901>)
- 959 Von der Malsburg K, Müller JM, Bohnert M, *et al.* 2011. Dual role of mitofilin in
 960 mitochondrial membrane organization and protein biogenesis. *Developmental Cell* **21**
 961 694–707. (<https://doi.org/10.1016/j.devcel.2011.08.026>)
- 962 Watson N, Kuppuswamy S, Ledford WL, *et al.* 2024. The role of HDAC3 in
 963 inflammation: mechanisms and therapeutic implications. *Front Immunol* **15** 1419685.
 964 (<https://doi.org/10.3389/fimmu.2024.1419685>)
- 965 Whitfield M, Thomas L, Bequignon E, *et al.* 2019. Mutations in DNAH17, encoding a
 966 sperm-specific axonemal outer dynein arm heavy chain, cause isolated male infertility
 967 due to asthenozoospermia. *Am J Hum Genet* **105** 198–212.
 968 (<https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2019.04.015>)

969 Yin H, Kang Z, Zhang Y, *et al.* 2021. HDAC3 controls male fertility through enzyme-
970 independent transcriptional regulation at the meiotic exit of spermatogenesis. *Nucleic*
971 *Acids Res* **49** 5106–5123. (<https://doi.org/10.1093/nar/gkab313>)

972