

Expressão de marcadores de qualidade seminal e fertilidade de garanhões da raça Crioula

Expression of Markers of Semen Quality and Fertility in Stallions of the Crioulo Breed

Isabela Trevisan Roesse¹, Verônica La Cruz Bueno^{1,2}, Henrique Boll de Araujo Bastos¹, Rodrigo Costa Mattos¹ & Sandra Fiala Rechsteiner^{1,2}

ABSTRACT

Background: Mammalian spermatozoa contain a complex RNA population able to regulate spermatogenesis and play a role in the fertilization process. However, little is known about genetic factors and their role in fertility. Discovering novel molecular markers is necessary because semen quality parameters and routine exams still fail at detecting cases of subfertility. The objective of this study was to assess the relationship between the expression of the genes *SPA17*, *TNF* and *TIMP2* by spermatozoa and semen quality, fertility, and motility parameters of sperm cells after thawing in stallions of the Crioulo breed.

Materials, Methods & Results: Analysis were performed on ejaculates from 40 stallions whose fertility was evaluated by checking their reproductive history, considering 30 inseminations for each animal. One mL of each ejaculate was reserved for fresh semen analysis, and the remaining volume was split into 2 samples; 1 of these samples was stored for gene expression analysis, and the other was cryopreserved. Sperm cell motility was analyzed using the computer-assisted semen analysis system. Sperm pathology analyses, hypoosmotic tests, and fluorescence tests were also performed. For gene expression analysis, mRNA was extracted for quantitation of expression of genes of interest by quantitative real-time polymerase chain reaction (qPCR). The results from qPCR assays were determined using an absolute standard curve [formula= $10^{(\text{target ct} - \text{standard CT})/\text{slope}}$]. Statistical analysis was performed using Pearson correlation. Expression of *SPA17* was positively correlated with functional integrity of the plasma membrane ($r = 0.602$; $P = 0.004$), structural integrity of the plasma membrane ($r = 0.590$; $P = 0.004$), conception rate ($r = 0.454$; $P = 0.007$), and total motility ($r = 0.522$; $P = 0.001$); it was negatively correlated with immobile sperm cells ($r = -0.558$; $P = 0.006$), and sperm cells with major defects ($r = 0.4907$; $P = 0.012$). Expression of *TNF* in sperm cells thawed after cryopreservation was positively correlated with curvilinear velocity (VCL) [$r = 0.5147$; $P = 0.02$], straight-line velocity (VSL) [$r = 0.4714$; $P = 0.03$], and average path velocity (VAP) [$r = 0.4907$; $P = 0.02$]. A positive correlation between *TIMP2* expression and beat-cross frequency (BCF) was found [$r = 0.408$; $P = 0.02$].

Discussion: The positive correlations between *SPA17* expression and the parameters total motility and conception rate may be related to the previously reported interaction of *SPA17* with the zona pellucida, which facilitates penetration of the sperm cell into the oocyte. The positive correlations between expression of *SPA17* and the parameters structural integrity of the plasma membrane and functionality of the plasma membrane are connected to characteristics important for viability of the sperm cell at the moment of conception, such as avoiding thermal shock and maintaining fluidity of the plasma membrane. Expression of *TNF* was positively correlated with sperm cell velocities after cryopreservation. *TNF* exerts a series of biological activities in different cell types. *TNF* regulates energy metabolism, especially in lipid homeostasis; it can be involved with plasma membrane phospholipid metabolism and reduce damage to the sperm cell during the cryopreservation process. We conclude that expression of *SPA17* in equine sperm cells can be used as a biomarker for semen quality and fertility of stallions, while expression of *TIMP2* can be used as a biomarker for beat-cross frequency. Expression of *TNF* was associated with better sperm cell survival rates after the cryopreservation process.

Keywords: stallion, fertility, concept rate, seminal quality, expression gene.

Descritores: garanhão, fertilidade, taxa de prenhez, qualidade seminal, expressão gênica.

DOI: 10.22456/1679-9216.128772

Received: 10 June 2023

Accepted: 27 September 2023

Published: 18 October 2023

¹Laboratório de Reprodução Animal da Faculdade de Veterinária (Reprolab), Faculdade de Veterinária (FAVET), Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil. ²Universidade Federal de Pelotas (UFPEL), Pelotas, RS, Brazil. CORRESPONDENCE: I. Roesse [isabelaroesse@gmail.com]. Avenida Copacabana n. 471, complemento 2. CEP 91.900-050 Porto Alegre, RS, Brazil.

INTRODUÇÃO

A fertilidade do garanhão é de extrema importância para a indústria do cavalo [30]. Os garanhões são selecionados para reprodução com base no seu pedigree, habilidades atléticas e características fenotípicas [9]. O potencial de fertilidade é deixado de lado na maioria das vezes [23].

Os parâmetros seminais e exames de rotina falham em detectar casos de subfertilidade ou infertilidade em garanhões [9]. Muito pouco se sabe sobre os fatores genéticos e seu papel na regulação da fertilidade. Espermatozoides de mamíferos possuem uma complexa população de RNAs, capazes de regular a espermatogênese, desempenhar papel na fecundação e no desenvolvimento embrionário inicial [2]. Descobertas em humanos revelaram que os espermatozoides contêm mRNAs que refletem a expressão do gene durante a espermatogênese [25].

O gene *Proteína Auto Antigênica do Espermatozoide (SPA17)* parece influenciar a ligação da zona pelúcida com o espermatozoide [29]. O gene *Fator de Necrose Tumoral- α (TNF- α)* é multifuncional e exerce uma série de ações em diferentes células, tecidos e espécies [8]. Já o gene *Inibidor Tecidual da Metaloproteinase 2 (TIMP-2)* está presente no plasma seminal e foi associado à alta fertilidade [18].

O objetivo do estudo foi avaliar a relação entre a expressão gênica de *SPA17*, *TNF- α* e *TIMP-2* no espermatozoide com a qualidade seminal, fertilidade e parâmetros cinéticos da célula espermática pós-descongelamento em garanhões da raça Crioula.

MATERIAIS E MÉTODOS

Animais

Foram utilizados 40 garanhões da raça Crioula, com idade entre 4 a 18 anos, com peso entre 450 a 500 kg, alimentados com concentrado e feno de alfafa diariamente, com água e sal mineral. Os garanhões, dos quais foi coletado 1 ejaculado, eram provenientes de centrais de reprodução próximas a Porto Alegre (30°S, 51°W), no estado do Rio Grande do Sul, Brasil.

Taxa de fertilidade

A fertilidade dos garanhões utilizados foi avaliada pelo histórico reprodutivo dos animais fornecido pelas centrais de reprodução que alojavam os garanhões, sendo que para cada garanhão foram consideradas 30 inseminações de diferentes éguas. O diagnóstico

de prenhez foi realizado através de ultrassonografia transretal aos 14 dias após inseminação artificial. Foram consideradas as últimas 2 estações reprodutivas, e a taxa de prenhez variou entre 20% a 95%.

Análise de sêmen

Para a coleta do sêmen, utilizou-se uma vagina artificial modelo Hannover com lubrificação e pré-aquecimento (42°C - 45°C). Imediatamente após a coleta o ejaculado foi filtrado, depositado em um tubo cônico de 45 mL e encaminhado para o Laboratório de Reprodução Animal da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, acondicionado em caixa térmica em temperatura ambiente, com limite máximo de transporte de 2 h, evitando danos à célula espermática. Um mL de cada ejaculado foi reservado para as análises do sêmen fresco e o restante foi separado em 2 partes, uma parte armazenada para avaliação da expressão gênica e a outra parte criopreservada. A concentração espermática foi avaliada por meio de câmara de Neubauer [3]. As avaliações de Motilidade Total (%) [MT], Motilidade Progressiva (%) [MP], Motilidade Rápida (%) [MR], Motilidade Lenta (%) [ML], Motilidade Local (%) [MC], Imóveis (%) [IM]; Velocidade de Trajeto (VAP, $\mu\text{m/s}$), Velocidade em Linha Reta (VSL, $\mu\text{m/s}$), Velocidade Curvilínea (VCL, $\mu\text{m/s}$), Linearidade (LIN, $\mu\text{m/s}$), Frequência de Batimento do Flagelo (BCF, $\mu\text{m/s}$), Deslocamento Lateral da Cabeça (ALH, $\mu\text{m/s}$), foram realizadas através do sistema de análise de sêmen computadorizado¹.

Para a análise da integridade física da membrana plasmática, 400 μL de sêmen foram incubados com 3 μL de iodeto de propídio (PI) e 2 μL de diacetato de carboxifluoresceína (CFDA), a 37°C por 8 min. A amostra foi avaliada por microscopia de epifluorescência, em aumento de 1000x, sob imersão. Um total de 100 espermatozoides por amostra foram avaliados. Foram considerados íntegros aqueles espermatozoides que apresentaram coloração verde [13].

A integridade funcional da membrana plasmática foi avaliada por meio do teste hiposmótico. Para tanto, 200 μL de água destilada foram adicionados a 100 μL de sêmen (osmolaridade: 100 mOsmol kg^{-1}). As amostras foram incubadas a 37°C por 8 min, posteriormente, amostras de sêmen foram analisadas em microscópio de contraste de fase em aumento de 400 x. Foram avaliados 100 espermatozoides por amostra e foram considerados com a membrana funcional os

espermatozoides em que houve um enrolamento da cauda [20].

Para avaliação da patologia espermática foi utilizado kit panótico², a lâmina com o esfregaço de sêmen foi mergulhada por 10 s nos corantes e imediatamente após a secagem, a lâmina foi levada ao microscópio em objetiva de imersão (1000 x) para análise, foram contadas 100 células espermáticas de cada amostra [6].

Criopreservação e descongelamento

As amostras foram centrifugadas a 600 g por 10 min, foi retirado o sobrenadante e o pellet ressuspensionado com diluente comercial próprio para congelamento BotuCrio³ previamente aquecido a 37°C até a concentração de 200 x 10⁶ de espermatozoides por mL, após foram envasadas em palhetas de 0,5 mL e lacradas com álcool polivinílico. A primeira etapa do congelamento foi realizada em refrigerador comercial, as palhetas foram dispostas horizontalmente a 5°C durante 20 min. Logo após, as palhetas foram acondicionadas horizontalmente em estante específica a 6 cm acima do nível de nitrogênio líquido em caixa de isopor para congelamento no vapor de nitrogênio durante 20 min. Sendo finalmente imersas em nitrogênio líquido [28]. Para fins de avaliação as amostras de sêmen foram descongeladas em banho-maria a 37°C durante 30 s. O sêmen descongelado foi submetido aos mesmos métodos de avaliação do sêmen fresco. As amostras foram descongeladas 60 dias após a criopreservação.

Reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (qPCR)

O restante do ejaculado foi dividido em tubos Falcon de 15 mL e centrifugado a 400 g durante 10 min. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o “pellet” restante no fundo do tubo Falcon foi ressuspensionado em meio BPS e centrifugado novamente, esse procedimento foi repetido 3 vezes. O pellet restante após as centrifugações foi novamente ressuspensionado em 2 mL de RNAlater⁴ em criotubo livre de RNA e armazenado em freezer a -80°C para posterior análise. No total, foram armazenados 750x10⁶ espermatozoides de cada garanhão. A extração do mRNA foi realizada através do Kit Comercial Trizol⁴, conforme instruções do fabricante. A conversão para cDNA foi realizada através de kit comercial SuperScript III Reverse Transcriptase⁴, conforme instruções do fabricante. A verificação da expressão dos genes *TIMP-2*, *SPA17* e *TNF-α* na célula espermática foi realizada através da técnica de qPCR. A amplificação do cDNA foi realizada por meio de primers específicos para equinos e estão listados na Tabela 1. Para reação foi utilizado o fluoróforo SYBR Green Master Mix⁴.

Os resultados quantitativos da qPCR foram determinados usando uma curva padrão absoluta [fórmula=10^(ct alvo - CT padrão)/slope]. Para análise estatística foi utilizado correlação de Pearson.

Tabela 1. Sequências de iniciadores para qPCR.

Gene	Primer (5'-3')	Temperatura*	Referências
<i>TIMP-2</i>	F: 5'-GGTGGACTCTGGGAACGACA-3' R: 3'-CGAGGAGGGAGCCGTGTAGA-5'	53°C	1
<i>TNF-α</i>	For 5'-GCTCCAGACGGTGCTTGTG-3' -GCCGATCACCCCAAAGTG-3'	57,5°C	2
<i>SPA17</i>	For 5' -TCCAAGGAGATGTCGATTCC Rev 5' -GTTGCTCCCTCAGAATCTCG	58°C	3

F:5':*Forward* (extremidade 5'); R:3':*Reverse* (extremidade 3'); *Temperatura de anelamento utilizada.

RESULTADOS

Foi encontrada correlação positiva do gene *SPA17* com integridade funcional da membrana plasmática ($r = 0,602 / P = 0,004$), integridade estrutural da membrana plasmática ($0,590 / P = 0,004$), taxa de concepção ($r = 0,454 / P = 0,007$), MT ($r = 0,522 / P = 0,00$), e correlação negativa com espermatozoides IM ($r = -0,558 / P = 0,006$) e espermatozoides com defeitos maiores ($r = 0,4601 / P = 0,012$). A Tabela 2 apresenta

a correlação do gene *SPA17* com qualidade seminal e fertilidade. Foi encontrada correlação positiva do gene *TNF- α* no espermatozoide pós-congelamento com VCL ($r = 0,5147 / P = 0,02$), VSL ($r = 0,4714 / P = 0,03$) e VAP ($r = 0,4907 / P = 0,02$). A Tabela 3 apresenta a correlação positiva do gene *TNF- α* com velocidades do espermatozoide após o descongelamento. Também foi encontrada correlação positiva do gene *TIMP-2* com BCF ($r = 0,408 / P = 0,02$).

Tabela 2. Correlação do gene *SPA17* com qualidade seminal e fertilidade do garanhão.

	Integridade funcional	Integridade estrutural	Taxa de concepção	Motilidade total	SPTZ imóveis	SPTZ defeito maiores
Valor de r	0,602	0,590	0,454	0,522	-0,558	-0,460
Valor de P	$P = 0,004$	$P = 0,004$	$P = 0,007$	$P = 0,00$	$P = 0,006$	$P = 0,012$

Tabela 3. Correlação positiva do gene *TNF- α* com velocidades do espermatozoide após o descongelamento.

	Velocidade curvilínea (VCL)	Velocidade linear progressiva (VSL)	Velocidade média da trajetória (VAP)
Valor de r	0,514	0,471	0,490
Valor de P	$P = 0,02$	$P = 0,03$	$P = 0,02$

DISCUSSÃO

Vários estudos estão sendo conduzidos para melhor entender as origens da infertilidade no garanhão. Diferentes abordagens transcriptômicas podem ser utilizadas para desvendar o papel dos genes associadas às funções vitais dos espermatozoides, como motilidade, capacitação e ligação do espermatozoide com a zona pelúcida, fundamentais para a fecundação. Neste trabalho, selecionamos os genes *SPA17*, *TNF- α* e *TIMP-2* para avaliar sua utilização como biomarcadores para a qualidade seminal e fertilidade do garanhão.

O gene *SPA17* codifica uma proteína de ligação à manose, acredita-se que ela esteja envolvida na regulação da maturação espermática, capacitação, reação acrossomal e interações com a zona pelúcida do oócito durante o processo de fecundação [7]. Em nosso estudo observamos correlação positiva de *SPA17* com a MT e correlação negativa com IM. A localização de *SPA17* na peça principal do espermatozoide parece ser impor-

tante para a sinalização e motilidade celular, uma vez que esta proteína pode regular a atividade da proteína de ancoragem da proteína quinase A (AKAP) [5,7].

No testículo humano, sugere-se que *SPA17* desempenhe um papel no processo de diferenciação celular devido a sua expressão nos diferentes estágios de maturação, como nos espermátócitos, espermátides e espermatozoides [15]. Demonstrou-se que os espermatozoides expressavam a proteína *SPA17* ao longo da peça principal do flagelo, especificamente na bainha fibrosa (FS), sendo *SPA17* considerada como uma nova proteína FS, estando presente de forma contínua na cauda do esperma desde os espermatozoides ejaculados até a fase de ligação deste com a zona pelúcida [7]. Outros estudos também identificaram no citoplasma da cabeça e em todas as regiões da cauda, sendo a maior expressão observada na cauda do espermatozoide, principalmente na peça principal [17,21]. Em nosso estudo o gene *SPA17* apresentou correlação positiva com a taxa de concepção ($r = 0,454 / P = 0,007$), o que pode

ser explicado devido sua capacidade de interagir com a zona pelúcida no momento fecundação, facilitando a penetração do oócito pelo espermatozoide.

Sugere-se que a baixa expressão de *SPA17* pode afetar a capacitação espermática e a ligação espermatozoide-oócito em pacientes inférteis normozoospermicos, indicando uma reação acrossômica comprometida [26]. Esses achados estão de acordo com nosso estudo, pois *SPA17* apresentou correlação negativa com espermatozoides com defeitos morfológicos maiores ($r = -0,4601 / P = 0,012$).

No presente estudo, a expressão do gene *SPA17* também demonstrou correlação positiva com integridade estrutural ($r = 0,590 / P = 0,004$) e funcionalidade ($r = 0,602 / P = 0,004$) da membrana plasmática, que são características fundamentais para que a célula espermática esteja viável no momento da fecundação, evitando o choque térmico e mantendo a fluidez da membrana plasmática [4].

Estudos mostraram que a proteína *SPA17* pode servir como biomarcador não invasivo associada ao processo de fecundação dos espermatozoides, visto que ela foi menos expressa em homens normozoospermicos inférteis quando comparados com homens normozoospermicos férteis [26].

O *TNF- α* está principalmente envolvido na regulação da proliferação celular e apoptose; além disso, possui propriedades pró-inflamatórias [27]. No testículo, o *TNF- α* é secretado pelas células germinativas e é considerado um dos fatores parácrinos testiculares que, junto com os hormônios do eixo hipotálamo-hipófise-testicular, regula a espermatogênese [10].

Nossos achados mostram que uma maior quantidade de RNAm para *TNF- α* foi correlacionada com a maior cinética espermática após criopreservação, sendo a ação do *TNF- α* positiva no processo de criopreservação. No presente estudo foi encontrada correlação positiva do gene *TNF- α* no espermatozoide pós-congelamento com VCL ($r = 0,5147 / P = 0,02$), VSL ($r = 0,4714 / P = 0,03$) e VAP ($r = 0,4907 / P = 0,02$).

A criopreservação provoca danos irreversíveis na membrana plasmática, e a estrutura da membrana plasmática é muito importante sob a perspectiva do choque térmico [11]. A exposição das células espermáticas à temperatura abaixo das fisiológicas, mesmo antes de ocorrer o congelamento, é responsável por mudanças na organização bidimensional dos lipídeos de membrana e também por alterações das

propriedades de enzimas encontradas na membrana, diminuindo a longevidade dos espermatozoides após a descongelação, através do adiantamento da capacitação espermática [16]. Também ocorrem danos durante o processo de descongelamento da célula, uma vez que a membrana é submetida a rearranjos estruturais envolvendo lipídios e proteínas, e a passagem rápida de água para o interior da célula pode causar o seu rompimento [16]. Sua integridade é fundamental para que a célula espermática esteja viável no momento da fecundação evitando o choque térmico e mantendo a fluidez da membrana plasmática [4].

O *TNF- α* é multifuncional e exerce uma série de ações biológicas em diferentes células, tecidos, órgãos e espécies e demonstrou regular e interferir no metabolismo energético, especialmente na homeostase lipídica [8]. Por isso sugerimos que pode estar envolvido no metabolismo dos fosfolipídios da membrana, diminuindo danos durante o processo de criopreservação. A expressão gênica do *TNF- α* demonstrou correlação moderada com a cinética espermática (VCL, VSL e VAP), podendo ser utilizada como um possível marcador para velocidade espermática após a criopreservação no espermatozoide equino.

A *TIMP-2* já foi identificada no sêmen, testículos e glândulas anexas de humanos, bovinos, equinos, carneiros, caninos, ratos e hamsters [1, 12, 18, 19, 22, 24]. A *TIMP-2* foi identificada ligada às membranas espermáticas e foi sugerida como tendo um papel na fertilidade de touros [22]. Foi demonstrado seu envolvimento na interação e remodelação da matriz extracelular no momento da interação dos espermatozoides com as células do cumulus, zona pelúcida e membrana oocitária [22]. Vale ressaltar que a *TIMP-2* inibe a atividade da metaloproteinase no esperma até a fecundação e reserva as funções da metaloproteinase necessárias para a interação espermatozoide-oócito e uma reação acrossômica [19]. O gene *TIMP-2* foi identificado no plasma seminal de ganhões, mostrando correlação com a fertilidade, visto que as melhores taxas de sobrevivência espermática durante o armazenamento resfriado na presença de plasma seminal foram associadas com uma maior abundância de *TIMP-2*. Assim, supõe-se que menos danos ao DNA do espermatozoide durante ao armazenamento estejam associados a níveis mais elevados de *TIMP-2* [18].

Estudos mostraram que o RNAm presente no espermatozoide para proteína *TIMP-2* foi mais abundante

em touros de alta fertilidade em comparação com touros de média e baixa fertilidade, e que a proteína *TIMP-2* localizou-se principalmente na cauda do esperma [19,32]. Em nosso estudo encontramos correlação positiva entre a expressão de *TIMP-2* com o BCF. Sabe-se que BCF juntamente com ALH e VCL são parâmetros indicativos do vigor espermático [14]. Amostras com elevados valores de BCF e têm revelado correlação positiva com a taxa de prenhez em alguns estudos [31].

CONCLUSÃO

A expressão de *SPA17* no espermatozoide equino pode ser utilizada como um biomarcador para a qualidade seminal e fertilidade do garanhão. A expressão de *TNF- α* apresentou correlação positiva foi com a velocidade espermática após a criopreservação no espermatozoide equino podendo ser utilizado como um biomarcador de velocidade espermática após a criopreservação. A expressão de *TIMP-2* pode ser utilizada como um biomarcador da frequência de BCF.

MANUFACTURERS

¹Minitüb GmbH. Tiefenbach, Germany.

²Laborclin Produtos para Laboratórios Ltda. Pinhais, PR, Brazil.

³Botupharma Indústria e Comércio de Produtos Veterinários. Botucatu, SP, Brazil.

⁴Thermo Fisher Scientific. Waltham, MA, USA.

Acknowledgements. The authors acknowledge the financial support by the following Brazilian agencies: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Ethical approval. All the experimental procedures are in accordance with Brazilian National Council for the Control of Animal Experimentation and were approved by the Brazilian Ethics Committee in Animal Experimentation at Universidade Federal de Pelotas (UFPEL), RS, Brazil, with the number of 2753-2018.

Declaration of interest. The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of paper.

REFERENCES

- 1 Baumgart E., Lenk S.V., Loening S.A. & Jung K. 2002. Quantitative differences in matrix metalloproteinase (MMP)-2, but not in MMP-9, tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)-1 or TIMP-2, in seminal plasma of normozoospermic and azoospermic patients. *Human Reproduction*. 17(11): 2919-2923.
- 2 Boerke A., Dieleman S.J. & Gadella B.M. 2007. A possible role for sperm RNA in early embryo development. *Theoriology*. 68: S147-S155.
- 3 Brito L.F.C. 2007. Evaluation of Stallion Sperm Morphology. *Clinical Techniques in Equine Practice*. 6(4): 249-264.
- 4 Bueno V.L.C., Paul L.G., Araujo Bastos H.B., Larentis G.R., Mattos R.C. & Rechsteiner S.F. 2020. Características seminais pós-descongelamento em garanhões da raça crioula. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*. 44(3): 100-107.
- 5 Carr D.W., Fujita A., Stentz C.L., Liberty G.A., Olson G.E. & Narumiya S. 2001. Identification of Sperm-specific Proteins That Interact with A-kinase Anchoring Proteins in a Manner Similar to the Type II Regulatory Subunit of PKA. *Journal of Biological Chemistry*. 276(20): 17332-17338.
- 6 CBRA. Colégio Brasileiro de Reprodução. 2013. *Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal*. 3.ed. Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal: 87p.
- 7 Chiriva-Internati M., Gagliano N., Donetti E., Costa F., Grizzi F., Franceschini B., Albani E., Levi-Setti P.E., Gioia M., Jenkins M., Cobos E. & Kast W.M. 2009. Sperm protein 17 is expressed in the sperm fibrous sheath. *Journal of Translational Medicine*. 7(1): 1-5.
- 8 Chen X., Xun K., Chen L. & Wang Y. 2009. *TNF- α* , a potent lipid metabolism regulator. *Cell Biochemistry and Function*. 27(7): 407-416.
- 9 Colenbrander B., Gadella B. & Stout T. 2003. The Predictive Value of Semen Analysis in the Evaluation of Stallion Fertility. *Reproduction in Domestic Animals*. 38(4): 305-311.
- 10 De S.K., Chen H.L., Pace J.L., Hunt J.S., Terranova P.F. & Enders G.C. 1993. Expression of tumor necrosis factor- α in mouse spermatogenic cells. *Endocrinology*. 133(1): 389-396.
- 11 Desai N., Mahfouz R., Sharma R., Gupta S. & Agarwal A. 2010. Reactive oxygen species levels are independent of sperm concentration, motility, and abstinence in a normal, healthy, proven fertile man: a longitudinal study. *Fertility and Sterility*. 94(4): 1541-1543.

- 12 Díaz-Pérez E. & Meizel S. 1992. Importance of mammalian sperm metalloendoprotease activity during the acrosome reaction to subsequent sperm-egg fusion: Inhibitor studies with human sperm and zona free hamster eggs. *Molecular Reproduction and Development*. 31(2): 122-130.
- 13 Garner D.L., Pinkel D., Johnson L.A. & Pace M.M. 1986. Assessment of spermatozoal function using dual fluorescent staining and flow cytometric analyses. *Biology of Reproduction*. 34(1): 127-138.
- 14 Gil M.C., García-Herreros M., Barón F.J., Aparicio I.M., Santos A.J. & García-Marín L.J. 2009. Morphometry of porcine spermatozoa and its functional significance in relation with the motility parameters in fresh semen. *Theriogenology*. 71(2): 254-263.
- 15 Grizzi F., Chiriva-Internati M., Franceschini B., Hermonat P.L., Soda G., Lim S. H. & Dioguardi N. 2003. Immunolocalization of Sperm Protein 17 in Human Testis and Ejaculated Spermatozoa. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. 51(9): 1245-1248.
- 16 Holt W.V. 2000. Basic aspects of frozen storage of semen. *Animal Reproduction Science*. 62(1-3): 3-22.
- 17 Intasqui P., Agarwal A., Sharma R., Samanta L. & Bertolla R.P. 2017. Towards the identification of reliable sperm biomarkers for male infertility: A sperm proteomic approach. *Andrologia*. 50(3): e12919. DOI: 10.1111/and.12919
- 18 Kareskoski A.M., Palviainen M., Johannisson A. & Katila T. 2020. Upregulation of CRISP 3 and kallikrein in stallion seminal plasma is associated with poor tolerance of cooled storage. *Reproduction in Domestic Animals*. 55(4): 496-502.
- 19 Kasimanickam V., Kasimanickam R., Arangasamy A., Saberivand A., Stevenson J.S. & Kastelic J.P. 2012. Association between mRNA abundance of functional sperm function proteins and fertility of Holstein bulls. *Theriogenology*. 78(9): 2007-2019.e2.
- 20 Lagares M. A., Petzoldt R., Sieme H. & Klung E. 1998. Preservação do sêmen fresco equino: avaliação da integridade da membrana espermática sob condições hiposmóticas. *Arquivos da Faculdade de Veterinária da UFRGS*. 26(1): 29-42.
- 21 Lea I.A., Widgren E.E. & O’Rand M.G. 2004. Association of sperm protein 17 with A-kinase anchoring protein 3 in flagella. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 2(1): 57. DOI: 10.1186/1477-7827-2-57
- 22 McCauley T.C., Zhang H.M., Bellin M.E. & Ax R.L. 2001. Identification of a heparin-binding protein in bovine seminal fluid as tissue inhibitor of metalloproteinases-2. *Molecular Reproduction and Development*. 58(3): 336-341.
- 23 Morris L.H.A. & Allen W.R. 2002. Reproductive efficiency of intensively managed Thoroughbred mares in Newmarket. *Equine Veterinary Journal*. 34(1): 51-60.
- 24 Moura A.A., Koc H., Chapman D.A. & Killian G.J. 2006. Identification of proteins in the accessory sex gland fluid associated with fertility indexes of dairy bulls: a proteomic approach. *Journal of andrology*. 27(2): 201-211.
- 25 Ostermeier G.C., Dix D.J., Miller D., Khatri P. & Krawetz S. A. 2002. Spermatozoal RNA profiles of normal fertile men. *The Lancet*. 360(9335): 772-777.
- 26 Panner Selvam M.K., Agarwal A., Pushparaj P.N., Baskaran S. & Bendou H. 2019. Sperm Proteome Analysis and Identification of Fertility-Associated Biomarkers in Unexplained Male Infertility. *Genes*. 10(7): 522. DOI: 10.3390/genes10070522
- 27 Pascarelli N.A., Fioravanti A., Moretti E., Guidelli G.M., Mazzi L. & Collodel G. 2017. The effects *in vitro* of *TNF- α* and its antagonist “etanercept” on ejaculated human sperm. *Reproduction, Fertility and Development*. 29(6): 1169-1177.
- 28 Papa F.O., Melo C.M., Fioratti E.G., Dell’Aqua Jr. J.A., Zahn F.S. & Alvarenga M.A. 2008. Freezing of stallion epididymal sperm. *Animal Reproduction Science*. 107(3-4): 293-301.
- 29 Richardson R.T., Yamasaki N. & O’Rand M.G. 1994. Sequence of a Rabbit Sperm Zona Pellucida Binding Protein and Localization during the Acrosome Reaction. *Developmental Biology*. 165(2): 688-701.
- 30 Suliman Y., Becker F. & Wimmers K. 2018. Implication of transcriptome profiling of spermatozoa for stallion fertility. *Reproduction, Fertility and Development*. 30(8): 1087-1098.
- 31 Versteegen J., Iguer-Ouada M. & Onclin K. 2002. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology*. 57(1): 149-179.
- 32 Viana A.G.A., Martins A.M.A., Pontes A.H., Fontes W., Castro M.S., Ricart C.A. O., Sousa MV., Kaya A., Topper E., Memili E. & Moura A.A. 2018. Proteomic landscape of seminal plasma associated with dairy bull fertility. *Scientific Reports*. 8(1): 1-13.