

## Mitocôndria espermática: além da síntese de adenosina trifosfato (ATP)

*Sperm mitochondrion: beyond ATP synthesis*

Diogo Ribeiro Câmara<sup>1,3</sup>, Maria Madalena Pessoa Guerra<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Rede Nordeste de Biotecnologia( RENORBIO), Curso de Medicina Veterinária da UFAL, Campus Arapiraca, Pólo Viçosa, Viçosa, AL, Brasil

<sup>2</sup>Departamento de Medicina Veterinária da UFRPE, Recife, PE, Brasil

<sup>3</sup>Correspondência: diogocamara1979@hotmail.com

### Resumo

A mitocôndria tem sido objeto de estudos mais intensivo nas últimas duas décadas, sendo essencial para a fisiologia espermática e responsável pela produção da maior parte da energia a partir da geração de ATP, possibilitando o movimento celular. Esta organela apresenta em seu interior o mtDNA capaz de transcreever diversas proteínas para a fosforilação oxidativa. Todavia, durante a espermatogênese, o número de mtDNA é reduzido. Por conseguinte, alterações no potencial de membrana mitocondrial ou mutações no mtDNA podem interferir nas características espermáticas e na fertilidade masculina. Objetivou-se com esse trabalho fazer uma breve revisão das características da mitocôndria espermática e sua importância para a reprodução masculina.

**Palavras-chave:** espermatozóide, mtDNA, apoptose, síntese de adenosina trifosfato.

### Abstract

*The Mitochondrion has been object of more intensive studies on the last two decades, being responsible to generate a bigger amount of cellular energy for cellular movement. This organelle has within it the mtDNA able to transcript many proteins to oxidative phosphorylation. Throughout spermatogenesis, the number of mtDNA is drastically reduced. Nevertheless the mitochondrion is still essential to sperm physiology, allowing this motility from ATP generation. On this way, mitochondrial membrane potential alterations or even mutations on mtDNA could reflect directly on sperm characteristics and, consequently, on the male infertility. This work aimed to do a brief revision about sperm mitochondria characteristics and his importance to male reproduction.*

**Keywords:** sperm, mtDNA, apoptosis, ATP synthesis.

### Introdução

A espermatogênese e a maturação espermática são processos muito peculiares de diferenciação celular. Uma série de reestruturações dos componentes celulares transforma uma célula imóvel numa espermátide oval e, em seguida, em um espermatozóide com vigorosa motilidade (Yaffe, 1997). Dentre os componentes celulares passíveis de modificações durante a espermatogênese, a mitocôndria, conhecida e descrita desde o início do século XX, tem sido objeto de estudos mais intensivos nas últimas duas décadas (Cummins, 1998).

De acordo com a hipótese endossimbiótica, organismos procariontes capazes de metabolizar oxigênio, como a bactéria púrpura não sulfúrica, são apontados como os progenitores filogenéticos da mitocôndria (Margulis, 1970). Em sua configuração, essa organela apresenta uma dupla membrana que envolve a matriz mitocondrial, onde se encontra uma ou mais moléculas de ácido desoxirribonucléico mitocondrial (mtDNA). De acordo com Cummins (1998), a membrana mitocondrial externa representa a membrana plasmática original do hospedeiro eucarionte invaginada, enquanto a membrana interna representa a parede da célula procariótica.

Lodish *et al.* (2003) afirmaram que as duas membranas que revestem a mitocôndria se diferenciam em composição e função. A membrana externa é composta de lipídios e proteínas, na proporção aproximada de 1:1, e contém porinas, tornando-a permeável a moléculas com massa molecular de até 10.000 daltons. A membrana interna, muito menos permeável, é composta por 20% de lipídeos e 80% de proteínas, a maior concentração de proteína existente em qualquer outra membrana celular, e emite um grande número de cristas em direção à matriz mitocondrial.

A mitocôndria é responsável por, aproximadamente, 90% da produção de energia celular, a qual ocorre por meio do processo de fosforilação oxidativa (FO). Esta organela também é responsável pela maior parte da produção endógena de espécies reativas ao oxigênio (ROS) como biometabólitos, sendo considerada a reguladora central da apoptose celular (Copeland, 2002).

O conjunto de ações da mitocôndria é comandado por aproximadamente 1000 genes, distribuídos em dois sistemas completamente diferentes presentes nas células dos mamíferos: o genoma nuclear e o mitocondrial (Copeland, 2002).

Mutações no mtDNA de células somáticas têm sido propostas como o principal contribuinte para doenças degenerativas dependentes da idade (Wallace, 1999). Além disso, a presença de determinados haplotipos detectados no mtDNA humano está relacionada à astenozoospermia (Wallace, 1995).

Considerando a crescente importância que vem sendo dada à mitocôndria, bem como sua influência na função celular, este trabalho objetivou fazer uma breve revisão das características da mitocôndria espermática e sua relevância para a reprodução masculina.

### Ácido desoxirribonucléico mitocondrial (mtDNA)

O mtDNA constitui o suporte para a hereditariedade citoplasmática, sendo uma molécula circular de dupla fita, com 16,5 kb, desprovida de histonas (May-Panloup *et al.*, 2006). Seu funcionamento ocorre de forma semi-autônoma, por meio de estímulo do fator de transcrição mitocondrial A (FTMA), originado do genoma nuclear, que é translocado à mitocôndria, atingindo seqüências-alvo (Clayton, 1998).

O mtDNA humano possui 37 genes e codifica 13 polipeptídeos dos complexos I, III, IV e V da cadeia de transporte de elétrons (CTE). De forma resumida, o mtDNA apresenta 22 ácidos ribonucléicos transportadores (tRNA) e dois ácidos ribonucléicos ribossomais (rRNA; Anderson *et al.*, 1981). Diferente do ácido desoxirribonucléico (DNA) nuclear, o mtDNA não possui íntrons entre cada um dos genes (St John, 2002).

Em cada mitocôndria, pode haver uma ou mais cópias de mtDNA, sendo esse número dependente do tipo celular, uma vez que quanto maior a utilização de adenosina trifosfato (ATP), maior o número de cópias (Moyes *et al.*, 1998). A replicação do mtDNA, independente do ciclo celular, é realizada de maneira bidirecional e não sincronizada (Clayton, 1982).

A taxa de mutações no mtDNA é, aproximadamente, dez vezes maior do que no genoma nuclear (Parsons *et al.*, 1997). As mutações pontuais têm sido descritas e indicam que a modificação de um simples par de bases pode resultar em disfunção espermática (St John *et al.*, 2005).

As deleções no mtDNA podem ser causadas por estresse oxidativo, sob influência de ROS, assim como pela ausência ou pelo mal funcionamento do mecanismo de recuperação do mtDNA espermático, resultando em mutações (Meinhardt *et al.*, 1999). Vale ressaltar que, em virtude de o processo de transcrição e o de replicação serem efetivamente concluídos nos primeiros estágios da espermatíde, dificilmente ocorrem deleções na célula espermática madura (Larsson *et al.*, 1997). A maior susceptibilidade a mutações embasa a hipótese de que a quantidade de mtDNA no gameta masculino deve ser reduzida ao longo da espermatogênese, mantendo um número de cópias suficiente para as necessidades energéticas do espermatozóide, ao mesmo tempo em que previne a transmissão parental de moléculas de mtDNA modificadas ou mutantes (Kao *et al.*, 2004).

### Mitocôndria e espermatogênese

A espermatogênese compreende um conjunto de sucessivas modificações celulares, caracterizado por multiplicação mitótica das espermatogônias e diferenciação em espermátócitos primários, conhecida como primeira divisão meiótica (reducional), seguida pelos espermátócitos secundários advindos da segunda divisão meiótica (equacional) e geração das espermatídes. Por fim, segue-se a espermiogênese, com a diferenciação das espermatídes em espermatozoides (Hafez, 2000).

Associado à progressão da meiose, as mitocôndrias iniciam as diferenciações, como alongação e dilatação do espaço intermembrana, conduzindo à condensação da matriz mitocondrial e à redução do número de criptas. Paralelamente, essa organela adquire ou perde diferentes marcadores protéicos, principalmente a partir do estágio de paquíteno (Seitz *et al.*, 1995).

Para Meinhardt *et al.* (1999), devido ao acesso direto das espermatogônias à glicose e ao oxigênio dos vasos sanguíneos testiculares, o metabolismo da mitocôndria espermatogonial é comparável ao das mitocôndrias de outros tecidos e órgãos. Entretanto, na diferenciação final das células germinativas, a localização das células, além da barreira hemato-testicular, faz com que estas recebam metabólitos que provêm menos energia que a glicose, como o lactato. No entanto, esse suprimento é indireto, através das células de Sertoli, causando substancial redução na cadeia respiratória e podendo ser uma das causas das modificações morfológicas observadas nas mitocôndrias ao longo da espermatogênese.

Durante a espermiogênese, algumas mitocôndrias se deslocam em direção ao flagelo em desenvolvimento, enquanto as demais se agrupam progressivamente e são liberadas pela célula espermática através do corpo residual, sendo provavelmente fagocitado pelas células de Sertoli (De Martino *et al.*, 1979). As mitocôndrias que se agruparam próximas ao flagelo atingem seu estágio máximo de alongação, assumindo uma relação íntima com as fibras densas da peça intermediária (De Martino *et al.*, 1979), e se organizam em uma hélice compreendida por 11 a 13 voltas em torno do flagelo espermático, com duas mitocôndrias por giro (Zamboni, 1991). No entanto, alguns autores citam que cada espermatozóide contém aproximadamente 50 a 75 mitocôndrias e uma cópia de mtDNA em cada uma delas (Michaels *et al.*, 1982).

Durante a espermatogênese, ocorre diminuição drástica no número de cópias de mtDNA (Rantanen e Larsson, 2000), decorrente da eliminação da maioria do citoplasma e de suas organelas (May-Panloup *et al.*,

2006), assim como da redução direta da produção de mtDNA, uma vez que, em ratos e homens, o fator de transcrição mitocondrial A, codificado pelo genoma nuclear e responsável pela duplicação do mtDNA, se expressa até os estágios iniciais da espermatide, quando uma isoforma alternativa que não possui seqüência-alvo na mitocôndria passa a ser produzida, reduzindo o número de mtDNA na célula espermática (Hecht e Liem, 1984).

Assim, o número estimado de cópias de mtDNA nas células espermáticas de diferentes espécies é bastante heterogêneo, variando de sete (Kao *et al.*, 2004) a 1500 (Manfredi *et al.*, 1997). Essa discordância provavelmente resulta da heterogeneidade das técnicas utilizadas para quantificação do genoma mitocondrial (May-Panloup *et al.*, 2006).

### **Produção de energia no espermatozóide**

As duas importantes formas de geração de adenosina trifosfato mitocondrial são o ciclo de Krebs e a  $\beta$ -oxidação, os quais precedem a fosforilação oxidativa, o maior gerador de adenosina trifosfato, por meio da cadeia de transporte de elétrons. As proteínas constituintes do processo de fosforilação oxidativa são incomuns a qualquer outro tipo de mecanismo celular e são codificadas pelos genomas nuclear e mitocondrial (St John *et al.*, 2005).

O sistema de fosforilação oxidativa é composto de cinco complexos enzimáticos localizados na membrana mitocondrial interna. Os complexos I a IV constituem a cadeia respiratória, cuja função é transferir os elétrons para as coenzimas redutoras. O complexo V, ou adenosina trifosfato sintetase, capta prótons da matriz mitocondrial para a síntese de adenosina trifosfato a partir de adenosina difosfato (ADP) e fosfato inorgânico (May-Panloup *et al.*, 2006).

As células espermáticas são metabolicamente flexíveis e, em algumas espécies, podem se manter entre o metabolismo aeróbico e o anaeróbico. Isso talvez reflita a grande variação de tensão de oxigênio a que estes gametas são submetidos, desde próximo à anóxia nos testículos e epidídimo até tensões ambientais na vagina e em ambientes *in vitro* (Cummins *et al.*, 1994).

Na célula espermática, as mitocôndrias estão localizadas apenas na peça intermediária, formando a bainha mitocondrial e produzindo adenosina trifosfato para a célula através de respiração aeróbica. Embora essa função seja similar à de todas as células somáticas, a mitocôndria espermática tem sido associada a isoformas protéicas, não detectadas em mitocôndrias de células somáticas, como as de lactato desidrogenase e hexoquinase (Travis *et al.*, 1998).

O axonema espermático possui um requerimento elevado de adenosina trifosfato como fonte de energia para promover a motilidade flagelar. Devido à restrição do número de mitocôndrias espermáticas na peça intermediária, o ATP produzido por essas mitocôndrias deve percorrer uma considerável distância para suprir as necessidades do axonema localizado em segmentos mais distais do flagelo (Turner, 2003). Desta forma, alguns autores acreditam que essa distância é muito grande para o adenosina trifosfato, originado da peça intermediária, se difundir adequadamente às porções mais distais do flagelo em tempo hábil (Storey e Kayne, 1975). Atualmente, supõe-se que a glicólise na peça principal, mas não necessariamente a fosforilação oxidativa na peça intermediária, seja o fator crítico para o funcionamento normal da célula espermática de mamíferos (Turner, 2003).

Há ainda relatos da presença de estoques de glicogênio no espermatozóide, assim como sugestões de que ele seria capaz de realizar a gliconeogênese (Ford, 2006), uma vez que evidências recentes demonstraram que cão, suíno, carneiro e garanhão contêm reservas de glicogênio associadas às atividades de glicogênio sintetase e glicogênio fosforilase (Palomo *et al.*, 2003).

Em condições fisiológicas, 1 a 3% dos elétrons envolvidos na cadeia de transporte de elétrons determina a formação de espécies reativas ao oxigênio (Guerin *et al.*, 2001). Em concentrações reduzidas, as espécies reativas ao oxigênio mediam funções espermáticas normais, como capacitação, hiperativação, reação acrossomal e fusão do espermatozóide com o ovócito. Todavia, a produção elevada de espécies reativas ao oxigênio induz ao estresse oxidativo e, conseqüentemente, modificações patofisiológicas nos espermatozoides (Aitken, 1999). Esse fenômeno apresenta um ciclo deletério: as espécies reativas ao oxigênio causam danos à membrana mitocondrial, que, em contrapartida, induz ao aumento da produção de espécies reativas ao oxigênio (Wang *et al.*, 2003).

### **Mitocôndria e apoptose espermática**

A fragmentação do DNA genômico é considerada um dos marcadores da apoptose, conhecida como a forma mais comum de morte das células eucarióticas (Donnelly *et al.*, 2000). A apoptose se diferencia da necrose, uma vez que, na primeira, a célula desempenha um papel fundamental e ativo para sua própria destruição, caracterizada por modificações ultra-estruturais e bioquímicas, coordenadas por induções genéticas e moleculares (Williams e Smith, 1993).

Tendo em vista que não ocorre transcrição e translação nas células espermáticas, alternativas têm sido propostas para a ocorrência de apoptose neste gameta, como atividade de endonucleases que culminam com a

fragmentação do DNA (Sakkas *et al.*, 1995) ou mediação por proteínas da superfície celular (Lee *et al.*, 1997). Independente desses fatores, os eventos apoptóticos têm início na mitocôndria. Essas organelas são requeridas para o eficiente metabolismo energético, a produção de lipídeos de membrana e o crescimento celular, mas também são as determinantes primárias da vida ou da morte celular (Arends e Wyllie, 1991). O envolvimento da mitocôndria na apoptose inclui a ativação de cisteínas conhecidas como caspases, a perda do potencial de membrana mitocondrial (PMM), as variações no potencial de oxidação-redução e o envolvimento de proteínas pró e antiapoptose, como a Bcl-2 (Donnelly *et al.*, 2000).

A seqüência normal de eventos que determinam a apoptose, de acordo com Kroemer *et al.* (1997), é a diminuição do potencial de membrana mitocondrial procedido pela fragmentação do DNA nuclear, a produção de espécies reativas ao oxigênio e, finalmente, o aumento na permeabilidade da membrana. Assim, uma das vantagens da utilização de marcadores da integridade funcional das mitocôndrias, com fins de mensuração da apoptose, é que alterações nesse sistema são detectáveis em estágios que antecedem as lesões do DNA genômico (Donnelly *et al.*, 2000).

De forma mais específica, tem sido postulado que existe o processo de seleção natural das células espermáticas ao longo do trajeto testículo-epidídimo, denominado apoptose abortiva (Sakkas *et al.*, 1999). É um mecanismo por meio do qual células supérfluas, indesejáveis ou danificadas são removidas para a manutenção da homeostase tissular (Marchetti *et al.*, 2002), necessária à espermatogênese funcional e ao desenvolvimento de espermatozoides maduros normais (Rodríguez *et al.*, 1997). Esse processo é mais acentuado em homens com parâmetros seminais anormais (Sakkas *et al.*, 1999).

### Mitocôndria e fertilidade masculina

O'Connell *et al.* (2002a) demonstraram que espermatozoides provenientes do testículo de homens com subfertilidade, mas com normozoospermia, apresentam uma quantidade de mtDNA maior do que os provenientes do epidídimo (45% vs 16%), respectivamente. Além disso, os espermatozoides epididimários apresentavam deleções do mtDNA em maior escala do que os espermatozoides testiculares. Essa situação pode ser explicada por falhas no sistema de apoptose abortiva que ocorre durante o trânsito testicular e epididimário, permitindo que uma grande quantidade de células espermáticas não sofra o processo apoptótico abortivo fisiológico, em virtude dos mesmos possuírem o processo de seleção espermática leniente, mantendo a concentração espermática apesar de seus defeitos funcionais (St John *et al.*, 2001).

Características de motilidade também podem estar relacionadas a variações de polimorfismos do mtDNA. Esses polimorfismos permitem diferenciar os grupos de mtDNA em haplogrupos, que refletem a evolução da população humana. Cerca de 99% da população européia possui 10 haplogrupos mitocondriais: H, I, J, K, M, T, U, V, W e X (Torroni *et al.*, 1996). Sua importância para a reprodução foi demonstrada por Ruiz-Pesini *et al.* (2000), ao relatarem normoespermia em pacientes que apresentavam o haplogrupo H em maior abundância, enquanto aqueles que manifestaram o haplogrupo T em maior quantidade exibiam astenozoospermia moderada, uma vez que possuíam a atividade dos complexos I e IV da cadeia de fosforilação oxidativa significativamente inferior à dos indivíduos normais.

Além da presença de haplogrupos específicos, a quantidade de mtDNA presente no espermatozoide também está relacionada à qualidade da célula, haja vista que espermatozoides anormais contêm um número de cópias de mtDNA 28 vezes superior, quando comparados aos normais. De maneira idêntica, considerando um mesmo ejaculado, as células separadas por gradientes de concentração também demonstraram diferenças na concentração de mtDNA. A primeira hipótese para explicar esse evento é que existe um fenômeno de *feed-back* permanente para compensação entre possíveis deficiências na cadeia de transporte de elétrons e aumento da taxa de mtDNA, ou seja, quanto mais falho o processo de produção de energia, mais mtDNA seriam codificados de forma compensatória. A segunda hipótese é que existiria um problema na diferenciação e na maturação dos espermatozoides de pacientes inférteis (May-Panloup *et al.*, 2006).

Vários marcadores fluorescentes, como Rodamina 123, DioC<sub>6</sub> (Wang *et al.*, 2003) e JC-1 (Kasimanickam *et al.*, 2007), têm sido utilizados para aferir o potencial de membrana mitocondrial dos espermatozoides, sugerindo que esse fator é um indicador da integridade funcional dos espermatozoides. Donnelly *et al.* (2000) demonstraram haver correlação negativa entre a motilidade espermática progressiva avaliada pelo CASA (*Computer Assisted Sperm Analysis*) e o percentual de espermatozoides com disfunção mitocondrial, tanto no sêmen humano *in natura*, quanto em amostras previamente submetidas à seleção por gradiente de Percoll, sendo essa técnica de seleção espermática capaz de reduzir significativamente a proporção de células com disfunção mitocondrial, quando comparado ao sêmen *in natura*. Troiano *et al.* (1998) ratificaram esses achados ao demonstrarem haver correlação positiva entre o potencial de membrana mitocondrial e a motilidade espermática.

A criopreservação do sêmen é uma biotécnica de difusão mundial, sendo que, após o processo de congelamento-descongelamento, a motilidade é um dos parâmetros mais severamente afetados (Watson, 1995). De acordo com Watson (2000), é geralmente aceito que a criopreservação é capaz de induzir a formação de espécies reativas ao oxigênio, seja devido à redução no sistema de proteção antioxidante (Bilodeau *et al.*, 2000) e

alteração na respiração e intervalos entre ciclos-respiratórios/estado de repouso celular (Schober *et al.*, 2007), ou à liberação de espécies reativas ao oxigênio pelas células espermáticas defeituosas ou mortas durante o procedimento de criopreservação (Bailey *et al.*, 2000). Acredita-se que a lesão na membrana mitocondrial induzida pelo choque térmico, fenômeno causado pelo resfriamento abrupto (Holt, 2000), pode ser menos severa do que aquela produzida pela congelação e descongelação espermática (Windsor e White, 1995).

Em estudos utilizando células espermáticas humanas, observou-se que não há aparente relação entre a atividade mitocondrial e a velocidade de deslocamento espermático pós-descongelação (O'Connell *et al.*, 2002a). Narisawa *et al.* (2002) demonstraram que, em ratos com fosforilação oxidativa mitocondrial espermática defeituosa, mas que ainda são capazes de promover a fertilização, os espermatozoides produzem adenosina trifosfato em concentração reduzida, porém apresentam motilidade, o que embasa a hipótese de que a principal fonte de energia para a motilidade é a glicólise, não a fosforilação oxidativa.

De forma contrária, St John *et al.* (2005), ao utilizarem inibidores da fosforilação oxidativa (rotenona, cianido de potássio e oligomicina) em ambiente com 2mM de glicose, determinaram inibição total da motilidade após 40 minutos de administração. Para esses autores, apesar de a célula espermática poder utilizar outros substratos para a síntese de adenosina trifosfato, a presença da glicose é a condição fundamental para a fisiologia espermática.

### Considerações finais

O aumento da expectativa de vida vem acompanhado por doenças degenerativas, principalmente em órgãos denominados pós-mitóticos, ou seja, que não apresentam divisão celular após sua formação, como o sistema nervoso e o coração. Muitas dessas doenças estão relacionadas a processos de envelhecimento e disfunção da atividade mitocondrial, seja pelo aumento do número de mutações, seja por lesões causadas pelas espécies reativas ao oxigênio.

Nas técnicas reprodutivas, o processo de conservação celular geralmente é realizado por meio da submissão da célula-alvo a gradientes osmóticos e temperaturas capazes de interferir com sua atividade metabólica, em consequência de alterações na função mitocondrial, culminando com aumento na produção de espécies reativas ao oxigênio.

Apesar de existirem mecanismos compensatórios para controle das espécies reativas ao oxigênio, muitas vezes os danos sobrepõem a capacidade de reestruturação celular, culminando com sua morte. Assim, o entendimento dos processos ligados ao funcionamento e às disfunções mitocondriais pode permitir a prevenção ou a reversão desses efeitos deletérios sobre a célula ou tecido, aumentando a longevidade ou reduzindo as lesões inerentes aos processos de criopreservação.

Técnicas sensíveis e específicas para aferição da função mitocondrial, como a taxa de consumo de oxigênio (Schober *et al.*, 2007) e os testes de aferição do potencial de membrana mitocondrial (O'Connell *et al.*, 2002b; Wang *et al.*, 2003; Kasimanickam *et al.*, 2007), tornaram-se ferramentas indispensáveis à avaliação da capacidade fertilizante do espermatozoide humano ou de outras espécies animais. Além disso, o desenvolvimento de terapias gênicas para correções de alterações no mtDNA pode, no futuro, auxiliar no tratamento de doenças degenerativas.

### Referências

- Aitken RJ. The human spermatozoa: a cell in crisis? *J Reprod Fertil*, v.115, p.1-7, 1999.
- Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, de Bruijn MH, Coulson AR, Drouin J, Eperon IC, Nierlich DP, Roe BA, Sanger F, Schreier PH, Smith AJ, Staden R, Young IG. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature*, v.290, p.457-465, 1981.
- Arends MJ, Wyllie AH. Apoptosis: mechanisms and role in pathology. *Int Rev Exp Pathol*, v.32, p.223-254, 1991.
- Bailey J L, Bilodeau J F, Cormier N. Semen cryopreservation in domestic animals: a damaging and capacitating phenomenon. *J Androl*, v.21, p.1-7, 2000.
- Bilodeau JF, Chatterjee S, Sirard MA, Gagnon C. Levels of antioxidant defenses are decreased in bovine spermatozoa after a cycle of freezing and thawing. *Mol Reprod Dev*, v.55, p.282-288, 2000.
- Clayton DA. Nuclear mitochondrial intergenomic communication. *Biofactors*, v.7, p.203-205, 1998.
- Clayton DA. Replication of animal mitochondrial DNA. *Cell*, v.28, p.693-705, 1982.
- Copeland WC. *Mitochondrial DNA: methods and protocols*. Totowa, NJ: Humana Press, 2002. 420p. (Methods in Molecular Biology, v.197).
- Cummins JM. Mitochondrial DNA in mammalian reproduction. *Rev Reprod*, v.3, p.172-182, 1998.
- Cummins JM, Jequier AM, Kan R. Molecular biology of human male infertility: links with aging, mitochondrial genetics, and oxidative stress. *Mol Reprod Dev*, v.37, p.345-362, 1994.
- De Martino C, Floridi A, Marcante ML, Malorni W, Scorza Barcellona P, Bellocchi M, Silvestrini B. Morphological, histochemical and biochemical studies on germ cell mitochondria of normal rats. *Cell Tissue*

*Res*, v.196, p.1-22, 1979.

**Donnelly ET, O'Connell M, McClure N, Lewis SE.** Differences in nuclear DNA fragmentation and mitochondrial integrity of semen and prepared human spermatozoa. *Hum Reprod*, v.15, p.1552-1561, 2000.

**Ford WCL.** Glycolysis and sperm motility: does a spoonful of sugar the flagellum go round? *Hum Reprod Update*, v.12, p.269-274, 2006.

**Guerin PF, Mouatassim S, Menezo Y.** Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. *Hum Reprod Update*, v.7, p.175-189, 2001.

**Hafez ESE.** *Reprodução animal*. 7.ed. São Paulo: Manole, 2000. 513p.

**Hecht NB, Liem H.** Mitochondrial DNA is synthesized during meiosis and spermatogenesis in the mouse. *Exp Cell Res*, v.154, p.293-298, 1984.

**Holt WV.** Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences. *Theriogenology*, v.53, p.47-58, 2000.

**Kao SH, Chao HT, Liu HW, Liao TL, Wei YH.** Sperm mitochondrial DNA depletion in man with asthenospermia. *Fertil Steril*, v.82, p.66-73, 2004.

**Kasimanickam R, Kasimanickam V, Pelzer KD, Dascanio JJ.** Effect of breed and sperm concentration on the changes in structural, functional and motility parameters of ram-lamb spermatozoa during storage at 4° C. *Anim Reprod Sci*, v.101, p.60-73, 2007.

**Kroemer G, Zamzami N, Susin SA.** Mitochondrial control of apoptosis. *Immunol Today*, v.18, p.44-51, 1997.

**Larsson NG, Oldfors A, Garman JD, Barsh GS, Clayton DA.** Down regulation of mitochondrial transcription factor A during spermatogenesis in humans. *Hum Mol Genet*, v.6, p.185-191, 1997.

**Lee J, Richburg JH, Younkin SC, Boekelheide K.** The Fas system is a key regulator of germ cells apoptosis in the testis. *Endocrinology*, v.138, p.2081-2088, 1997.

**Lodish H, Berk A, Matsudaira P, Kaiser CA, Krieger M, Scott MP, Zipursky L, Darnell J.** *Molecular cell biology*. 5.ed. New York, NY: Freeman, 2003. 961p.

**Manfredi G, Thyagarajan D, Papadopoulou LC, Pallotti F, Schon EA.** The fate of human sperm-derived mtDNA in somatic cells. *Am J Hum Genet*, v.61, p.953-960, 1997.

**Marchetti C, Obert G, Deffosez A, Formstecher P, Marchetti P.** Study of mitochondrial membrane potential, reactive oxygen species, DNA fragmentation and cell viability by flow cytometry in human sperm. *Hum Reprod*, v.17, p.1257-1265, 2002.

**Margulis L.** *Origin of eukaryotic cells*. New Haven: Yale University Press, 1970. 349p.

**May-Panloup P, Chréten MF, Malthiery Y, Reynier P.** ADN mitochondrial du spermatozoide. *Gynecol Obstet Fertil*, v.34, p.847-854, 2006.

**Meinhardt A, Wilhelm B, Seitz J.** Mini symposium: new aspects of spermatogenesis: expression of mitochondrial marker proteins during spermatogenesis. *Hum Reprod Update*, v.5, p.108-119, 1999.

**Michaels GS, Hauswirth WW, Laipis PJ.** Mitochondrial DNA copy number in bovine oocytes and somatic cells. *Dev Biol*, v.94, p.246-251, 1982.

**Moyes CD, Battersby BJ, Leary SC.** Regulation of muscle mitochondrial design. *J Exp Biol*, v.201, p.299-307, 1998.

**Narisawa S, Hecht NB, Goldberg E, Boatright KM, Reed JC, Millán JL.** Testis-specific cytochrome c-null mice produce functional sperm undergo early testicular atrophy. *Mol Cell Biol*, v.22, p.5554-5562, 2002.

**O'Connell M, McClure N, Lewis SE.** Mitochondrial DNA deletion and nuclear DNA fragmentation on testis and epididymal human sperm. *Hum Reprod*, v.17, p.1565-1570, 2002a.

**O'Connell M, McClure N, Lewis SE.** The effects of cryopreservation on sperm morphology, motility and mitochondrial function. *Hum Reprod*, v.17, p.704-709, 2002b.

**Palomo MJ, Fernandez-Novell JM, Peña A, Guinovart JJ, Rigau T, Rodríguez-Gil JE.** Glucose- and fructose-induced dog-sperm glycogen synthesis shows specific changes in the location of sperm glycogen deposition. *Mol Reprod Dev*, v.64, p.349-359, 2003.

**Parsons TJ, Muniec DS, Sullivan K, Woodyatt N, Alliston-Greiner R, Wilson MR, Berry DL, Holland KA, Weedn VW, Gill P, Holland MM.** A high observed substitution rate in the human mitochondrial DNA control region. *Nat Genet*, v.14, p.363-368, 1997.

**Rantanen A, Larsson NG.** Regulation of mitochondrial DNA copy number during spermatogenesis. *Hum Reprod*, v.15, suppl.2, p.86-91, 2000.

**Rodríguez I, Ody C, Araki K, Garcia I, Vassalli P.** An early and massive wave of germinal cell apoptosis is required for the development of functional spermatogenesis. *EMBO J*, v.16, p.2262-2270, 1997.

**Ruiz-Pesini E, Lapeña AC, Díez-Sánchez C, Pérez-Martos A, Montoya J, Alvarez E, Díaz M, Urriés A, Montoro L, López-Pérez MJ, Enríquez JA.** Human mtDNA haplogroups associated with high or reduced spermatozoa motility. *Am J Hum Genet*, v.67, p.682-696, 2000.

**Sakkas D, Manicardi G, Bianchi PG, Bizzaro D, Bianchi U.** Relationship between presence of endogenous nicks and sperm chromatin packaging in mature and fertilizing mouse spermatozoa. *Biol Reprod*, v.52, p.1149-1155, 1995.

**Schober D, Aurich C, Nohl H, Gille L.** Influence of cryopreservation on mitochondrial functions in equine



- spermatozoa. *Theriogenology*, v.68, p.745-754, 2007.
- Seitz J, Möbius J, Bergmann M, Meinhardt A.** Mitochondrial differentiation during meiosis of male germ cells. *Int J Androl*, v.18, Supp.2, p.7-11, 1995.
- St John JC.** The transmission of mitochondrial DNA following assisted reproductive techniques. *Theriogenology*, v.57, p.109-123, 2002.
- St John JC, Jokhi RP, Barratt CL.** Men with oligoasthenoteratozoospermia harbour higher number of multiple mitochondrial DNA deletions in their spermatozoa, but individual deletions are not indicative of overall aetiology. *Mol Hum Reprod*, v.7, p.103-111, 2001.
- St John JC, Jokhi RP, Barratt CL.** The impact of mitochondrial genetics on male infertility. *Int J Androl*, v.28, p.65-73, 2005.
- Storey BT, Kayne FJ.** Energy metabolism of spermatozoa. V. The Embden-Myerhof pathway of glycolysis activities of pathway enzymes in hipotonically treated rabbit epididymal spermatozoa. *Fert Steril*, v.26, p.1257-1265, 1975.
- Torroni A, Huoponen K, Francalacci P, Petrozzi M, Morelli L, Scozzari R, Obinu D, Savontaus ML, Wallace DC.** Classification of European mtDNA's from an analysis of three European populations. *Genetics*, v.144, p.1835-1850, 1996.
- Travis AJ, Foster JA, Rosenbaum NA, Visconti PE, Gerton GL, Kopf GS, Moss SB.** Targeting of a germ cell specific type I hexokinase lacking a porin-binding domain to the mitochondria as well as to the head and fibrous sheath of murine spermatozoa. *Mol Biol Cell*, v.9, p.263-276, 1998.
- Troiano L, Granata AR, Cossarizza A, Kalashnikova G, Bianchi R, Pini G, Tropea F, Carani C, Franceschi C.** Mitochondrial membrane potential and DNA stainability in human sperm cells: a flow cytometry analysis with implications for male infertility. *Exp Cell Res*, v.241, p.384-393, 1998.
- Turner RM.** Tales from the tail: what do we really know about sperm motility? *J Androl*, v.24, p.790-802, 2003.
- Wallace DC.** Mitochondrial diseases in man and mouse. *Science*, v.283, p.1482-1487, 1999.
- Wallace DC.** Mitochondrial DNA variation in human evolution, degenerative disease, and aging. *Am J Hum Genet*, v.57, p.201-223, 1995.
- Wang X, Sharma RK, Gupta A, George V, Thomas AJ, Falcone T, Agarwal A.** Alterations in mitochondria membrane potential and oxidative stress in infertile men: a prospective observational study. *Fertil Steril*, v.80, suppl.2, p.844-850, 2003.
- Watson PF.** Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reprod Fertil Dev*, v.7, p.871-891, 1995.
- Watson PF.** The cause of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim Reprod Sci*, v.60, p.481-492, 2000.
- Williams GT, Smith CA.** Molecular regulation of apoptosis genetic controls on cell death. *Cell*, v.74, p.777-779, 1993.
- Windsor DP, White IG.** Mitochondrial injury to ram sperm during procedures associated with artificial insemination or frozen storage. *Anim Reprod Sci*, v.40, p.43-58, 1995.
- Yaffe MP.** Mitochondrial morphogenesis: fusion factor for fly fertility. *Curr Biol*, v.7, p.782-783, 1997.
- Zamboni L.** Physiology and pathophysiology of the human spermatozoon: the role of electron microscopy. *J Electron Microscop Tech*, v.17, p.412-436, 1991.