



Ferramentas para avaliação da funcionalidade da mitocôndria espermática

Tools for evaluating the functionality of sperm mitochondria

D.S.R. Angrimani¹, J.D.A. Losano, B.R. Rui, L.C. Bicudo, A.F.C. Andrade,
R.P. Arruda, E.C.C. Celeghini

Departamento de Reprodução Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo (USP),
São Paulo, SP, Brasil.

¹Correspondência: angrimani@gmail.com

Resumo

A mitocôndria é a principal fonte de energia para a motilidade e a homeostase espermática. Durante a fosforilação oxidativa são produzidos metabólitos, denominados espécies reativas de oxigênio (EROs), as quais desempenham papel fundamental nos processos fisiológicos. No entanto, disfunções mitocondriais podem causar desequilíbrio entre a produção de EROs e os mecanismos antioxidantes, provocando o estresse oxidativo, letal para a célula espermática. Assim, como essa organela está envolvida tanto nos processos fisiológicos quanto nos patológicos dos espermatozoides, fica clara a importância de se avaliar sua funcionalidade. Portanto, o objetivo desta revisão é descrever as possíveis técnicas de avaliação da funcionalidade das mitocôndrias espermáticas por meio da atividade e do potencial da membrana mitocondrial, da mensuração dos níveis de ATP e ADP e da mensuração dos níveis de cálcio.

Palavras-chave: espermatozoide, metabolismo energético, potencial mitocondrial, sondas fluorescentes.

Abstract

Mitochondria are the major source of energy for sperm motility and to the homeostasis. During the oxidative phosphorylation metabolites called Reactive Oxygen Species (ROS), are produced and play a key role for the physiological processes. However, mitochondrial dysfunctions can cause an imbalance between ROS production and antioxidant mechanisms cause oxidative stress, lethal for spermatozoa. Thus, as this organelle is involved both in physiological or pathological processes of sperm, it is clear the importance of evaluating its functionality. Therefore, the aim of this review is to describe the possible techniques for assessing functionality of sperm mitochondria and these assessments of activity and mitochondrial membrane potential, measuring the levels of ATP and ADP and measurement the levels of calcium.

Keywords: energy metabolism, fluorescent probes, mitochondrial evaluation, sperm.

Introdução

A mitocôndria possui papel central na viabilidade e na morte celular, estando relacionada com a funcionalidade da célula espermática, principal fonte de energia para motilidade e homeostase celular (St. John, 2002). Os espermatozoides perfazem um interessante modelo celular para avaliação da função mitocondrial devido ao fato de as mitocôndrias espermáticas estarem dispostas de maneira helicoidal na peça intermediária e de o espermatozoide possuir o citoplasma extremamente reduzido, facilitando a visualização na presença de marcadores fluorescentes (Reers et al., 1991; Halliwell e Gutteridge, 1999).

Na década de 80, Hrudka (1987) já havia desenvolvido a técnica citoquímica para avaliação da atividade mitocondrial. Posteriormente, surgiram algumas ferramentas empregando marcadores fluorescentes para estimar o potencial da membrana mitocondrial, destacando-se o uso de rodaminas e carbocianinas (Bryla e Trzcinska, 2015; Castro et al., 2016; Nabi et al., 2016). Assim, as aferições da atividade e do potencial da membrana mitocondrial fornecem índices interessantes, entretanto não podem ser confundidas, já que alguns trabalhos demonstram que mitocôndrias com baixo potencial da membrana mitocondrial devido à ação de desacopladores são capazes de manter ou aumentar sua atividade mediante o transporte de elétrons entre os complexos enzimáticos e, conseqüentemente, nas reações de oxidação (Terada, 1990).

Independentemente de os dois parâmetros serem indicadores da função mitocondrial, estes não quantificam a eficiência energética de um conjunto de células. Dessa forma, pesquisas surgiram com o objetivo de avaliar o metabolismo energético do espermatozoide, como a mensuração dos níveis de ATP, complementando a avaliação do *status* mitocondrial (Irvine e Aitken, 1985). Além disso, a concentração de cálcio intracelular pode ser aferida, já que esse mineral é considerado um regulador central da fosforilação oxidativa e pode estar associado a processos patológicos em concentrações inadequadas (Berridge et al., 1998).

Assim, a utilização de ferramentas para avaliar a funcionalidade mitocondrial do espermatozoide associadas a outras análises espermáticas, pode aproximar as pesquisas da predição da capacidade mitocondrial



de determinada amostra seminal. Portanto, o objetivo desta revisão é descrever a importância de se avaliar a mitocôndria espermática e diferentes técnicas de avaliação mitocondrial, utilizadas em associação ou não, que podem indicar possíveis disfunções mitocondriais e mensurar a capacidade energética de uma amostra seminal.

O paradoxo mitocondrial

A necessidade de organismos aeróbicos respirarem é consequência da demanda de oxigênio para a mitocôndria, que, por meio da fosforilação oxidativa, produz aproximadamente 90% da energia celular, na forma da molécula de ATP (adenosina trifosfato), na qual a energia é armazenada para posterior utilização (Chen, 1988). Tal energia armazenada é fundamental para a funcionalidade do espermatozoide, atuando diretamente na motilidade e na homeostase celular (St. John, 2002).

Apesar desse papel fundamental da mitocôndria no metabolismo celular, durante a fosforilação oxidativa, são produzidos metabólitos denominados espécies reativas de oxigênio (EROs), as quais possuem papel fundamental em diversos processos fisiológicos, tais como a hiperativação espermática (De Lamirande et al., 1993), a capacitação (Aitken et al., 2004), a reação acrossomal (De Lamirande et al., 1998) e a interação entre o espermatozoide e a zona pelúcida (Aitken et al., 1995). A mitocôndria parece ser a principal fonte de EROs, e cerca de 2% do oxigênio consumido é convertido em ânion superóxido, considerado a primeira etapa da formação das EROs (Koppers et al., 2008). No entanto, eventuais desequilíbrios entre a produção de EROs e os mecanismos antioxidantes caracterizam o estresse oxidativo, que pode ser letal para as células espermáticas (Halliwell e Gutteridge, 1999). Estudos vêm demonstrando correlações negativas tanto entre o estresse oxidativo e a integridade de DNA quanto com a alta atividade mitocondrial, o que indica que tais variáveis estão interligadas, formando possivelmente um mecanismo patogênico único (Blumer et al., 2012). Como a mitocôndria é a principal fonte liberadora de fatores pró-oxidativos, sugere-se que tal organela possui papel central no desequilíbrio oxidativo. Estudos relacionam as disfunções mitocondriais causadas pela criopreservação espermática ao estresse oxidativo e à diminuição da atividade mitocondrial (O'Connell et al., 2002). Fica claro que essa organela pode impactar tanto positivamente quanto negativamente nos processos de fecundação. De fato, Kasai et al. (2002) comprovaram que maiores taxas de fecundação *in vitro* são obtidas de amostras espermáticas com alto potencial da membrana mitocondrial. Ainda, Troiano et al. (1998) detectaram alta porcentagem de espermatozoides com baixo potencial da membrana mitocondrial em amostras espermáticas provenientes de pacientes inférteis.

Avaliação do potencial da membrana mitocondrial

Alguns marcadores fluorescentes conseguem avaliar o potencial da membrana mitocondrial, que está relacionado à capacidade da mitocôndria em bombear prótons da matriz mitocondrial para o espaço intermembranas, por meio da energia livre gerada pelo transporte de elétrons, produzindo um gradiente eletroquímico (Chen, 1988). O mecanismo de incorporação das sondas fluorescentes ocorre quando esta se difunde livremente pela membrana plasmática até o citosol da célula e se acumula eletroforicamente na matriz da mitocôndria metabolicamente ativa, guiada por força motriz de próton gerado por transferência de cadeia de elétron localizada na membrana mitocondrial interna (Celeghini et al., 2007). Para tal, destacam-se a Rodamina 123, o Mito Tracker Green FM e o JC-1 (iodeto de 5,5',6,6'-tetracloro-1,1,3,3'-tetraetilbenzimidazolilcarbocianina).

Rodamina 123

A Rodamina 123 (R123) é uma sonda fluorescente específica para mitocôndrias em células vivas (Garner et al., 1997) e é constituída de molécula lipofílica, catiônica, com excitação a 488nm e emissão de fluorescência verde a 515-575nm (Gravance et al., 2000). Tem sido amplamente utilizada para avaliação do potencial da membrana mitocondrial de espermatozoides em diversas espécies, como humanos (Lim et al., 2010), equinos (Gravance et al., 2000) e bovinos (Yoon et al., 2015).

A ligação dessa sonda na mitocôndria é difícil de ser calculada, devido à heterogeneidade dessas organelas nas células, como, por exemplo, o número de mitocôndrias maduras e imaturas. Ademais, as mitocôndrias de uma única célula podem ter diferentes sítios de ligação à R123, com consequente emissão de diferentes intensidades de fluorescência (Cossarizza et al., 1993), não sendo possível, assim, diferenciar alto potencial mitocondrial de baixo (Celeghini et al., 2007).

Apesar de o uso da R123 ser vantajoso por ser altamente específico para células vivas e por não causar toxicidade celular (Celeghini et al., 2007), tem-se a desvantagem da ocorrência de ligações não específicas em outros compartimentos celulares do espermatozoide, como cabeça e/ou cauda (Garner et al., 1997), uma vez que sua absorção pode ser afetada pelo potencial da membrana plasmática, que pode concentrar R123 no citoplasma em relação ao meio por sua carga interior também ser negativa (Chen, 1988).



Mito Tracker Green FM (MITO)

O Mito Tracker Green FM (MITO) é capaz de avaliar o potencial da membrana mitocondrial ligando-se à membrana mitocondrial interna e promovendo fluorescência de coloração verde em células vivas (Gillan et al., 2005). Apresenta excitação em comprimento de onda de 490nm e emissão a 516nm (Celeghini et al., 2007). O MITO é prontamente sequestrado pela mitocôndria com potencial da membrana (Garner et al., 1997). A peça intermediária do espermatozoide com mitocôndria funcional apresenta fluorescência verde intensa, enquanto a peça intermediária do espermatozoide com mitocôndria afuncional não emite fluorescência ou emite fluorescência verde opaca (Celeghini et al., 2007). Além de não diferenciar potenciais de membrana alto e baixo (Gillan et al., 2005), o MITO possui a desvantagem de se ligar inespecificamente a outras porções do espermatozoide, que não as mitocôndrias, produzindo fluorescência de menor intensidade na membrana da cabeça ou da cauda (Celeghini et al., 2010).

Dessa maneira, a utilização de novas sondas que não produzem ligação inespecífica e que detectam diferenças entre alto e baixo potencial da membrana mitocondrial, como o JC-1, torna-se mais interessante, fazendo com que marcadores como a R123 e o MITO sejam menos utilizados (Celeghini et al., 2007).

JC-1

O iodeto de 5,5', 6,6' tetracloro 1,1,3,3' tetraetilbenzimidazolilcarbocianina (JC-1) é um tipo especial de carbocianina, capaz de identificar a diferença de potencial mitocondrial. Essa sonda fluorescente é metacromática: mitocôndrias com baixo potencial da membrana mitocondrial emitem fluorescência verde devido à formação de monômeros de carbocianinas, enquanto em alto potencial, esses monômeros se agregam, formando multímeros, também chamados de J-agregados, que emitem fluorescência vermelha (Reers et al., 1991).

O JC-1 vem sendo amplamente utilizado, para detectar casos de infertilidade masculina (Hu et al., 2009), avaliar o efeito da função mitocondrial nas taxas de fecundação *in vitro* (Kasai et al., 2002) e do potencial mitocondrial de espermatozoides equinos (Pukazhenthil et al., 2014), murinos (Zobeiri et al., 2013) e bovinos (Castro et al., 2016), além de atuar como ferramenta para avaliar o efeito da criopreservação espermática ante diferentes crioprotetores (Celeghini et al., 2008).

Esse marcador fluorescente também pode ser associado a outros, como o Hoechst 33342, o iodeto de propídeo e a aglutinina do *Pisum sativum* conjugada ao isotiocionato de fluoresceína (FITC-PSA), para avaliar a integridade das membranas plasmática e acrossomal simultaneamente à avaliação do potencial da membrana mitocondrial, por não competir com o comprimento de onda dessas outras sondas e não possuir ligações inespecíficas (Celeghini et al., 2007). Além disso, Garner et al. (1997) verificaram que o JC-1 apresentou maior sensibilidade para avaliar o potencial da membrana mitocondrial quando comparado às sondas Mito Tracker Green e Rodamina 123 em amostras de sêmen bovino criopreservadas.

Avaliação da atividade mitocondrial

A avaliação da atividade mitocondrial visa observar a eficiência do transporte de elétrons entre os complexos enzimáticos, estando envolvidos, por exemplo, nas reações de oxidação desempenhadas durante a fosforilação oxidativa (Terada, 1990).

H2-CMXros e CMXros

As sondas fluorescentes H2-CMXros e CMXros, conhecidas comercialmente como Mito Tracker Red[®], foram desenvolvidas com o intuito de avaliar a atividade mitocondrial. A CMXros é catiônica e se liga livremente à mitocôndria, ao contrário da H2-CMXros, que emite fluorescência apenas quando ocorre oxidação (Wojcik et al., 2000). Segundo Poot et al. (1996), o CMXros emite fluorescência na cor vermelha, com emissão máxima de 594nm, excitação máxima em torno de 608nm, e permite leitura posterior à fixação em lâmina com formaldeído. Celeghini et al. (2007) avaliaram diversas sondas fluorescentes em espermatozoides bovinos e notaram que o CMXros só emitia fluorescência em mitocôndrias com alta atividade mitocondrial, não havendo fluorescência em mitocôndrias com baixa ou média atividade, o que revelava a desvantagem desta sonda, por não permitir a classificação da atividade mitocondrial.

3'3 diaminobenzidina (DAB)

Ainda com o intuito de avaliar a atividade mitocondrial, Hudkha (1987) desenvolveu um ensaio citotóxico baseado na oxidação da 3'3 diaminobenzidina (DAB) pelo citocromo-C, enzima envolvida no transporte de elétrons entre os complexos enzimáticos, que produz a coloração marrom nas mitocôndrias, quando visualizada por meio de microscopia de contraste de fase. O DAB pode ser classificado em quatro classes (I, II,



III e IV), de acordo com a atividade mitocondrial, variando de alta (classe I), intermediária (classe II), baixa (classe III) a inexistente (classe IV; Losano et al., 2015).

Mensuração dos níveis de cálcio intramitocondrial

Durante os processos da respiração celular desempenhados pela mitocôndria espermática, o cálcio (Ca^{2+}) exerce papel-chave como regulador central dos eventos ocorridos na fosforilação oxidativa, como, por exemplo, na taxa de produção de NADH, atuando nos complexos enzimáticos do piruvato-desidrogenase, isocitrato-desidrogenase e α -cetoglutarato desidrogenase (McCormack et al., 1990). O Ca^{2+} também está envolvido em processos de produção de ATP, atuando na proteína ATPsintase, responsável por formar moléculas de ATP (Territo et al., 2001). Ademais, diversos estudos demonstram que o Ca^{2+} pode estar diretamente envolvido em eventos de apoptose celular (Berridge et al., 1998; Gunter et al., 2004). Portanto, a dosagem dos níveis de cálcio intramitocondrial pode contribuir não só para a avaliação do funcionamento mitocondrial, mas também como indicativo de apoptose celular.

A aferição dos níveis de cálcio em espermatozoides já foi relatada por microscopia de fluorescência, tendo como sondas utilizadas a Quin 2-AM (Irvine e Aitken, 1986), a fluo-3/AM (Giojalas, 1998) e a indo-1AM (Brewis et al., 2000). Entretanto, ainda se objetiva criar índices de referência para a dosagem de Ca^{2+} e relacionar os valores encontrados com as variáveis de potencial e atividade mitocondrial (Amaral et al., 2013).

Mensuração dos níveis de ATP e ADP

A mensuração dos níveis de ATP visa detectar o produto final da fosforilação oxidativa, enquanto a dosagem dos níveis de ADP avalia a ação da enzima ATPase, que transforma uma molécula de ATP em ADP, fosfato e liberação de energia (Stock et al., 2000). Entre os métodos utilizados para a detecção dos níveis de ATP e ADP, podem ser utilizada a cromatografia líquida de alta *performance* (Samizo et al., 2001) ou a dosagem por *kits* comerciais (Perchec et al., 1995). Vários autores já relataram a utilização das mensurações de ATP e ADP em diversas espécies, como camundongos (Mukai e Okuno, 2004), passeriformes (Rowe et al., 2013) e suínos (Martins et al., 2014), contudo índices que calculem a produção com o gasto de ATP, e a relação da produção com o funcionamento mitocondrial ainda devem ser mais estudados.

Novas perspectivas para a avaliação mitocondrial

A avaliação da atividade e do potencial mitocondrial contribui para melhor compreensão do funcionamento fisiológico da mitocôndria espermática, assim como a dosagem de Ca^{2+} e a mensuração dos níveis de ATP e ADP. Entretanto, outras opções de ferramentas podem surgir como alternativa para a avaliação mitocondrial. Dentre essas ferramentas, destaca-se a imunocitoquímica, na qual podem ser detectadas proteínas de interesse, na região mitocondrial da célula (Sciacco e Bonilla, 1996). Essa técnica foi relatada em espermatozoides de mamíferos, com a detecção de cisteína mitocondrial, possivelmente relacionada com astenozoospermia em camundongos (Nayernia et al., 2002). A microscopia eletrônica de transmissão (MET) é outra técnica que explora possíveis alterações mitocondriais, seja por eletrodensidade, vacuolização, seja pela disposição das mitocôndrias na peça intermediária dos espermatozoides. Em homens, já foram descritas que alterações estruturais nas mitocôndrias, observadas pela MET, podem acarretar quadros de astenozoospermia (Visco et al., 2010; Pelliccione et al., 2011). Ademais, foi possível observar vacuolização, enrolamento e desorganização de mitocôndrias após processos de criopreservação (Shi et al., 2014). Ainda, vale ressaltar a aplicação da técnica de microscopia de força atômica, utilizada até então com mitocôndrias teciduais, mas que pode trazer informações pertinentes sobre o funcionamento da organela, como dinâmica de abertura e fechamento de poros presentes na membrana mitocondrial (Layton e Boyd, 2011).

Considerações finais

O funcionamento mitocondrial de maneira ordenada e aprimorada é crucial para os espermatozoides de mamíferos, sendo altamente relacionado com altas taxas de funcionalidade e fertilidade da célula espermática. Dessa forma, a avaliação criteriosa da atividade, do potencial e do metabolismo mitocondrial surge como ferramenta para o sucesso na seleção de animais de interesse reprodutivo. Para tal, a escolha da técnica deve ocorrer considerando-se a localidade, os equipamentos disponíveis e o objetivo determinado, para, assim, otimizar a mão de obra e os esforços despendidos.

Referências

Aitken RJ, Paterson M, Fisher H, Buckingham DW, Van Duin M. Redox regulation of tyrosine phosphorylation in human spermatozoa and its role in the control of human sperm function. *J Cell Sci*, v.108,



p.2017-2025, 1995.

Aitken RJ, Ryan AL, Baker MA, McLaughlin EA. Redox activity associated with the maturation and capacitation of mammalian spermatozoa. *Free Radic Biol Med*, v.36, p.994-1010, 2004.

Amaral A, Lourenco B, Marques M, Ramalho-Santos J. Mitochondria functionality and sperm quality. *Reproduction*, v.146, p.R163-174, 2013.

Berridge MJ, Bootman MD, Lipp P. Calcium-a life and death signal. *Nature*, v.395, n.6703, p.645-648, 1998.

Blumer CG, Restelli AE, Giudice PTD, Soler TB, Fraietta R, Nichi M, Bertolla RP, Cedenho AP. Effect of varicocele on sperm function and semen oxidative stress. *BJU Int*, v.109, p.259-265, 2012.

Brewis IA, Morton IE, Mohammad SN, Browes CE, Moore HD. Measurement of intracellular calcium concentration and plasma membrane potential in human spermatozoa using flow cytometry. *J Androl*, v.21, p.238-249, 2000.

Bryla M, Trzcinska M. Quality and fertilizing capacity of boar spermatozoa during liquid storage in extender supplemented with different antibiotics. *Anim Reprod Sci*, v.163, p.157-163, 2015.

Castro L, Assis PM, Siqueira AFP, Hamilton TRS, Mendes CM, Losano JDA, Nichi M, Visintin JA, Assumpção MEOA. Sperm oxidative stress is detrimental to embryo development: a dose-dependent study model and a new and more sensitive oxidative status evaluation. *Oxid Med Cell Longev*, v.2016, 12p., 2016. doi: 10.1155/2016/8213071.

Celeghini ECC, Andrade AFC, Raphael CF, Nascimento J, Ticianelli JS, Arruda RP. Damage assessment of the equine sperm membranes by fluorimetric technique. *Braz Arch Biol Technol*, v.53, p.1285-1292, 2010.

Celeghini ECC, Arruda RP, Andrade AFC, Nascimento J, Raphael CF. Practical techniques for bovine sperm simultaneous fluorimetric assessment of plasma, acrosomal and mitochondrial membranes. *Reprod Domest Anim*, v.42, p.479-488, 2007.

Celeghini ECC, Arruda RP, Andrade AFC, Nascimento J, Raphael CF, Rodrigues PHM. Effects that bovine sperm cryopreservation using two different extenders has on sperm membranes and chromatin. *Anim Reprod Sci*, v.104, p.119-131, 2008.

Chen LB. Mitochondrial membrane potential in living cells. *Annu Rev Cell Biol*, v.4, p.155-181, 1988.

Cossarizza A, Baccarani-Contri M, Kalashnikova G, Franceschi C. A new method for the cytofluorimetric analysis of mitochondrial membrane potential using the J-aggregate forming lipophilic cation 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolcarbocyanine iodide (JC-1). *Biochem Biophys Res Commun*, v.197, p.40-45, 1993.

De Lamirande E, Cagnon C. Human sperm hyperactivation and capacitation as parts of an oxidative process. *Free Radic Biol Med*, v.14, p.157-166, 1993.

De Lamirande EVE, Tsai C, Harakat A, Gagnon C. Involvement of reactive oxygen species in human sperm acrosome reaction induced by A23187, lysophosphatidylcholine, and biological fluid ultrafiltrates. *J Androl*, v.19, p.585-594, 1998.

Garner DL, Thomas CA, Joerg HW, Dejarnette JM, Marshall CE. Fluorometric assessments of mitochondrial function and viability in cryopreserved bovine spermatozoa. *Biol Reprod*, v.57, p.1401-1406, 1997.

Gillan L, Evans G, Maxwell WM. Flow cytometric evaluation of sperm parameters in relation to fertility potential. *Theriogenology*, v.63, p.445-457, 2005.

Giojalas LC. Correlation between response to progesterone and other functional parameters in human spermatozoa. *Fertil Steril*, v.69, p.107-111, 1998.

Gravance CG, Garner DL, Baumber J, Ball BA. Assessment of equine sperm mitochondrial function using JC-1. *Theriogenology*, v.53, p.1691-1703, 2000.

Gunter TE, Yule DI, Gunter KK, Eliseev RA, Salter JD. Calcium and mitochondria. *FEBS Lett*, v.567, p.96-102, 2004.

Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free Radicals in Biology and Medicine*. 3rd ed. New York: Oxford University Press, 1999. 936p,

Hrudka F. Cytochemical and ultracytochemical demonstration of cytochrome c oxidase in spermatozoa and dynamics of its changes accompanying ageing or induced by stress. *Int J Androl*, v.10, p.809-828, 1987.

Hu Y, Xia X, Pan L, Lu N, Wu Y, Zhou X, Shang X, Cui Y, Huang Y. Evaluation of sperm mitochondrial membrane potential in varicocele patients using JC-1 fluorescent staining. *Nat J Androl*, v.15, p.792-795, 2009.

Irvine D, Aitken R. The value of adenosine triphosphate (ATP) measurements in assessing the fertilizing ability of human spermatozoa. *Fertil Steril*, v.44, p.806-813, 1985.

Irvine DS, Aitken RJ. Measurement of intracellular calcium in human-spermatozoa. *Gamete Res*, v.15, p.57-71, 1986.

Kasai T, Ogawa K, Mizuno K, Nagai S, Uchida Y, Ohta S, Fujie M, Suzuki K, Hirata S, Hoshi K. Relationship between sperm mitochondrial membrane potential, sperm motility, and fertility potential. *Asian J Androl*, v.4, p.97-104, 2002.

Koppers AJ, De Iuliis GN, Finnie JM, McLaughlin E A, Aitken RJ. Significance of mitochondrial reactive oxygen species in the generation of oxidative stress in spermatozoa. *J Clin Endocrinol Metab*, v.93, p.3199-3207,



2008.

Layton BE, Boyd MB. Atomic force microscopy of isolated mitochondria. *Methods Mol Biol*, v.736, p.133-151, 2011.

Lim JJ, Shin TE, Song SH, Bak CW, Yoon TK, Lee DR. Effect of liquid nitrogen vapor storage on the motility, viability, morphology, deoxyribonucleic acid integrity, and mitochondrial potential of frozen-thawed human spermatozoa. *Fertil Steril*, v.94, p.2736-2741, 2010.

Losano JDA, Angrimani DSR, Pereira RJG, Rocha AM, Criscuolo TS, Barnabe VH, Barnabe RC, Mendes CM, Assumpção MEOA, Nichi M. Utilisation of sperm-binding assay combined with computer-assisted sperm analysis to evaluate frozen-thawed bull semen. *Andrologia*, v.47, p.77-84, 2015.

McCormack JG, Halestrap AP, Denton RM. Role of calcium ions in regulation of mammalian intramitochondrial metabolism. *Physiol Rev*, v.70, p.391-425, 1990.

Martins SMMK, Andrade AFC, Zaffalon FG, Bressan FF, Pugine SMP, Melo MP, Chiaratti MR, Marino CT, Moretti AS, Arruda RP. Organic selenium supplementation increases PHGPx but does not improve viability in chilled boar semen. *Andrologia (Berlin)*, v.47, p.85-90, 2014.

Mukai C, Okuno M. Glycolysis plays a major role for adenosine triphosphate supplementation in mouse sperm flagellar movement. *Biol Reprod*, v.71, p.540-547, 2004.

Nabi MM, Kohram H, Zhandi M, Mehrabani-Yeganeh H, Sharideh H, Zare-Shahaneh A, Esmaili V. Comparative evaluation of Nabi and Beltsville extenders for cryopreservation of rooster semen. *Cryobiology*, v.72, p.47-52, 2016.

Nayernia K, Adham IM, Burkhardt-Gottges E, Neesen J, Rieche M, Wolf S, Sancken U, Kleene K, Engel W. Asthenozoospermia in mice with targeted deletion of the sperm mitochondrion-associated cysteine-rich protein (Smcp) gene. *Mol Cell Biol*, v.22, p.3046-3052, 2002.

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

Pelliccione F, Micillo A, Cordeschi G, D'Angeli A, Necozone S, Gandini L, Lenzi A, Francavilla F, Francavilla S. Altered ultrastructure of mitochondrial membranes is strongly associated with unexplained asthenozoospermia. *Fertil Steril*, v.95, p.641-646, 2011.

Percec G, Jeulin C, Cosson J, Andre F, Billard R. Relationship between sperm ATP content and motility of carp spermatozoa. *J Cell Sci*, v.108, p.747-753, 1995.

Poot M, Zhang YZ, Kramer JA, Wells KS, Jones LJ, Hanzel DK, Lugade AG, Singer VL, Haugland RP. Analysis of mitochondrial morphology and function with novel fixable fluorescent stains. *J Histochem Cytochem*, v.44, p.1363-1372, 1996.

Pukazhenti BS, Johnson A, Guthrie HD, Songsasen N, Padilla LR, Wolfe BA, Coutinho M, Alvarenga MA, Wildt DE. Improved sperm cryosurvival in diluents containing amides versus glycerol in the Przewalski's horse (*Equus ferus przewalskii*). *Cryobiology*, v.68, p.205-214, 2014.

Reers M, Smith TW, Chen LB. J-aggregate formation of a carbocyanine as a quantitative fluorescent indicator of membrane potential. *Biochemistry*, v.30, n.18, p.4480-4486, 1991.

Rowe M, Laskemoen T, Johnsen A, Lifjeld JT. Evolution of sperm structure and energetics in passerine birds. *Proc R Soc B - Biol Sci*, v.280, n.1753, 9p., 2013. doi: 10.1098/rspb.2012.2616.

Samizo K, Ishikawa R, Nakamura A, Kohama K. A highly sensitive method for measurement of myosin ATPase activity by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Anal Biochem*, v.293, p.212-215, 2001.

Sciacco M, Bonilla E. Cytochemistry and immunocytochemistry of mitochondria in tissue sections. *Methods Enzymol*, v.264, p.509-521, 1996.

Shi L, Ren Y, Zhou H, Hou G, Xun W, Yue W, Zhang C, Yang R. Effect of rapid freezing-thawing techniques on the sperm parameters and ultrastructure of Chinese Taihang black goat spermatozoa. *Micron*, v.57, p.6-12, 2014.

St. John JC. The transmission of mitochondrial DNA following assisted reproductive techniques. *Theriogenology*, v.57, p.109-123, 2002.

Stock D, Gibbons C, Arechaga I, Leslie AG, Walker JE. The rotary mechanism of ATP synthase. *Curr Opin Struct Biol*, v.10, p.672-679, 2000.

Terada H. Uncouplers of oxidative phosphorylation. *Environ Health Perspect*, v.87, p.213-218, 1990.

Territo PR, French SA, Dunleavy MC, Evans FJ, Balaban RS. Calcium activation of heart mitochondrial oxidative phosphorylation: rapid kinetics of mVO₂, NADH, AND light scattering. *J Biol Chem*, v.276, p.2586-2599, 2001.

Troiano L, Granata A R M, 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.

Visco V, Raffa S, Elia J, Delfino M, Imbrogno N, Torrisi MR, Mazzilli F. Morphological sperm defects analyzed by light microscopy and transmission electron microscopy and their correlation with sperm motility. *Int J Urol*, v.17, p.259-266, 2010.



Yoon SJ, Kwon WS, Rahman MS, Lee JS, Pang MG. A novel approach to identifying physical markers of cryo-damage in bull spermatozoa. *PloS One*, v.10, n.5, p.e0126232, 2015.

Wojcik C, Sawicki W, Marianowski P, Benchaib M, Czyba JC, Guerin JF. Cyclodextrin enhances spermicidal effects of magainin-2-amide. *Contraception*, v.62, p.99-103, 2000.

Zobeiri F, Salami S, Sadrkhanlou R, Peirouvi T. Role of mitochondria in ciprofloxacin-induced apoptosis in murine sperm cells. *Reprod Sci*, v.20, p.1090-1095, 2013.
