



Peça intermediária de espermatozoides bovinos: Funções e anormalidades

Midpiece of Bovine Spermatozoa: Functions and Abnormalities

Edgar Andrés Díaz-Miranda^{1,4}, Thiago Peixoto Machado¹, Jurandy Mauro Penitente-Filho¹, Denise Silva Okano¹, Paula Piccolo Maitan¹, Mariana Machado-Neves², Simone Eliza Facioni Guimarães³, José Domingos Guimarães¹

¹Departamento de Veterinária, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, Brasil.

²Departamento de Biologia Geral, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, Brasil.

³Departamento de Zootecnia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, Brasil.

⁴Correspondência: eddimi07@hotmail.com

Resumo

O reprodutor tem grande importância na cadeia produtiva por possuir maior potencial de difusão do seu material genético dentro do rebanho do que as fêmeas que produzem apenas uma cria por ano, em manejo de monta natural. Entretanto, este potencial somente se torna real quando os machos apresentam boa qualidade seminal, resultando em menores taxas de retorno ao estro. No entanto, apesar das características reprodutivas apresentarem baixa herdabilidade, é consensual que algumas patologias espermáticas possam apresentar características hereditárias e neste caso podem permanecer disseminadas nos rebanhos. Entre as anomalias espermáticas identificadas nos ejaculados de bovinos, as patologias de peça intermediária são classificadas como defeitos espermáticos maiores, comprometendo a fertilidade dos reprodutores, porém estas têm recebido pouca atenção. O objetivo deste trabalho de revisão é apresentar os principais estudos sobre a formação da peça intermediária, sua importância e como esta pode sofrer anormalidades, visto que ejaculados com presença destas anomalias apresentam baixa motilidade espermática e fertilidade.

Palavras-chave: mitocôndrias, patologia espermática, subfertilidade.

Abstract

Bulls are of immense importance in the productive chain because they have a greater potential of diffusion of genetic material within the herd than females that produce only one calf per year in natural mating management. However, this potential is only achieved when males present good seminal quality, resulting in lower rates of return to estrus. Although the reproductive traits have low heritability, it is consensual that some sperm pathologies may present hereditary characteristics and in this case they can remain disseminated in the herds. Among the sperm abnormalities identified in bovine ejaculates, the midpiece pathologies are classified as a major sperm defect, compromising bull fertility, but these pathologies have received little attention. The objective of this review is to present the main studies on the midpiece formation, its importance and how it can undergo abnormalities, since ejaculates with the presence of this pathology present low sperm motility and fertility.

Keywords: mitochondria, sperm pathology, subfertility.

Introdução

As patologias espermáticas têm sido associadas com a subfertilidade ou infertilidade de machos na maioria das espécies, portanto defeitos morfológicos observados nos espermatozoides estão diretamente relacionados com a fertilidade (Attia et al., 2016). As causas de estrutura defeituosa nos espermatozoides podem ser de origem ambiental ou genética, ou ainda a combinação de ambas. Embora as causas ambientais sejam consideradas como as mais comuns, e que a herdabilidade da fertilidade de touros é considerada baixa, há defeitos estruturais dos espermatozoides que são considerados de origem genética (Johnson, 1997; Chenoweth, 2005).

Percentuais de defeitos de peça intermediária menores que 5% são comuns em touros (Barth e Oko, 1989). Além de fatores genéticos (Blom, 1959; Koefoed-Johnson et al., 1980), a frequência de ocorrência destas patologias pode estar relacionada a doenças virais (Chenoweth e Burgess, 1972), deficiência e/ou falha no metabolismo do selênio (Pallini e Bacci, 1979), consumo de gossipol (Chenoweth et al., 2000), ou de origem desconhecida (idiopático). Independente das causas, anomalias de peça intermediária geralmente estão relacionadas a diferentes graus de comprometimento da fertilidade (Johnson, 1997; Rocha et al., 2006).

Os componentes estruturais exteriores da cauda dos espermatozoides, ou seja, as bainhas mitocondrial e fibrosa, desempenham papel de apoio durante a motilidade espermática, estas estruturas devem ser elásticas e fortes para sustentar e conter a flexão do axonema (Olson e Linck, 1977). Deficiências estruturais da bainha mitocondrial, tais como aplasia, edema e agenesia, podem ocasionar danos na estrutura e integridade do

axonema, resultando em ampla variedade de defeitos de peça intermediária. Por isso, patologias de peça intermediária geralmente são observadas juntas, como o *DAG defect*, *corkscrew*, *stump defect*, aplasia segmentar da bainha mitocondrial, fraturas, desfibrilação, edema, peça intermediária curta, e dupla peça intermediária (Veeramachaneni, 2011).

As patologias de peça intermediária têm sido pouco estudadas (Rawe et al., 2007; Moretti et al., 2016), mesmo sendo classificadas como defeitos maiores por sua relevância na fertilidade (Blom, 1973). Assim, esta revisão tem como objetivo compilar os principais estudos existentes sobre a formação da peça intermediária nos espermatozoides, explicando como anormalidades de peça intermediária podem afetar a viabilidade e fertilidade dos espermatozoides.

Formação da bainha mitocondrial

Os espermatozoides de mamíferos são células altamente polarizadas e especializadas, cujas organelas constituintes estão organizadas em locais específicos, de tal modo que funções especializadas são localizadas em regiões subcelulares específicas (Turner, 2003). A peça intermediária dos espermatozoides de mamíferos é caracterizada por uma bainha mitocondrial helicoidal que envolve o axonema e as nove fibras densas exteriores (Woolley, 1970; Phillips, 1977). Além disso, o comprimento da peça intermediária e o número de giros da bainha mitocondrial são uniformes e de características hereditárias (Woolley e Beatty, 1967). No entanto, os mecanismos que regulam a distribuição e o desenvolvimento do padrão helicoidal da peça intermediária não são completamente compreendidos (Olson e Winfrey, 1986; 1990; Ho e Wey, 2007; Rawe et al., 2007; Sun e Yang, 2010; Zhang et al., 2012).

Nos espermatozoides bovinos, a peça intermediária apresenta 12 μm de comprimento, incluindo a região da peça conectora. Nesta, as mitocôndrias estão arranjadas geralmente paralelas ao eixo longitudinal dos espermatozoides. Entre a peça conectora e o *annulus*, as mitocôndrias estão dispostas principalmente numa hélice tripla, embora em algumas regiões estejam dispostas numa hélice quádrupla, sendo a hélice composta por 64 giros (Phillips, 1977). Sabe-se que as mitocôndrias são responsáveis pela geração da maior parte do ATP do espermatozoide, que é requerido para seu metabolismo, motilidade, manutenção da homeostase de Ca^{++} , e geração de espécies reativas de oxigênio (ERO). Além disso, elas desempenham papel importante na maturação, capacitação e regulação da apoptose (Turner, 2003; Aitken et al., 2007; Amaral et al., 2013). Portanto, defeitos mitocondriais causam disfunções fisiológicas que dão origem a muitas patologias, incluindo infertilidade (Ramalho-Santos et al., 2009).

Com respeito à morfologia das mitocôndrias, muda do tipo chamado “ortodoxo” para o tipo “intermediário” e posteriormente para forma “condensada” durante a diferenciação das espermatogônias em espermátides haploides (Meinhardt et al., 1999; Sun e Yang, 2010). Durante a espermiogênese, as mitocôndrias começam a se alongar e se aglutinar, logo depois migram para assumir uma forma helicoidal ao redor do flagelo, desse modo as mitocôndrias na peça intermediária perdem o aspecto morfológico condensado para o tipo intermediário (em forma de cristas crescentes com menos matriz condensada), formando a bainha mitocondrial ao redor do flagelo (Meinhardt et al., 1999). Parte das mitocôndrias é marcada pela ubiquitina e, quando marcadas, saem das espermátides em desenvolvimento e são fagocitadas pelas células de Sertoli (Sutovsky et al., 1999). Além disso, espermatozoides com defeitos apresentam altos índices de ubiquitinação nas mitocôndrias, sendo descartados durante a espermiogênese ou nos epidídimos, de fato, a ubiquitina tem sido utilizada como critério para avaliação da qualidade espermática (Sun e Yang, 2010; Sutovsky, 2015).

Além disso, há diferença ultraestrutural na membrana externa das mitocôndrias da peça intermediária, que consiste no espessamento da membrana externa (10 nm) com cinco camadas ao invés de três (Elfvin, 1968). De acordo com Bedford e Calvin (1974), a membrana externa das mitocôndrias dos espermatozoides é estabilizada por pontes de dissulfeto (juntamente com núcleo, fibras densas, e outros componentes), possivelmente para o fortalecimento desta estrutura, que é frequentemente exposta a deformações devido ao movimento flagelar, podendo estar relacionada à sua maior resistência às condições hipotônicas e à sua impermeabilidade em relação ao citocromo C (Keyhani e Storey, 1973).

Outro componente relacionado à estabilidade da membrana mitocondrial externa no espermatozoide é o selênio, essencial no processo de espermatogênese em touros por se ligar a proteínas estruturais das mitocôndrias (Pallini e Bacci, 1979). Calvin et al. (1981) identificaram um selenopolipeptídeo ou proteína estrutural rica em cisteína das cápsulas mitocondriais (SMCP), que cobre a membrana externa queratinosa das mitocôndrias dos espermatozoides, denominada cápsula mitocondrial, que é essencial para a montagem da bainha mitocondrial e está relacionada a algumas propriedades das mitocôndrias de espermatozoides, tais como manutenção da forma de crista crescente da membrana exterior (Djureinovic et al., 2014). Acreditava-se que a SMCP fosse a proteína mais predominante na cápsula mitocondrial, mas foi demonstrado que 50% da cápsula é constituída pelo fosfolípido hidroperóxido glutathiona peroxidase (PHGPx), que funciona como enzima citosólica em células somáticas e como proteína estrutural enzimaticamente inativa na cápsula mitocondrial (Ursini et al., 1999).

Cada mitocôndria da peça intermediária é organizada de modo que a sua superfície alcance três

componentes celulares diferentes, a membrana plasmática, mitocôndrias vizinhas e o complexo de axonema-fibras densas exteriores. Estes domínios de superfície são estruturalmente distintos. O domínio da membrana mitocondrial em contato com a membrana plasmática é o mais frágil dos três. Sua função parece estar relacionada à importação de metabólitos utilizados para geração de energia. Já os outros domínios, no entanto, agem como citoesqueleto, na montagem e/ou manutenção das mitocôndrias no desenvolvimento da peça intermediária, sendo compostos por proteínas adesivas (Olson e Winfrey, 1992). Além disso, as mitocôndrias também sofrem remodelação estrutural durante a passagem dos espermatozoides nos epidídimos (Woolley, 1970; Olson e Hamilton, 1976).

Possíveis causas de Patologias de Peça Intermediária no Espermatozoide

Segundo Olson e Winfrey (1990), existem dois mecanismos estruturais em espermatozoides que podem gerar e/ou manter o padrão regular da peça intermediária. No primeiro, as mitocôndrias adjacentes estão unidas umas às outras por elementos com função de pontes, apresentando-se espaçadas regularmente, e ligadas diretamente nas membranas mitocondriais exteriores. Já no segundo mecanismo, as mitocôndrias estão aderidas ao retículo submitocondrial (SMR) localizado exclusivamente na peça intermediária. O SMR é composto por fitas de material elétron-denso longitudinalmente orientadas e lateralmente interligadas, dispostas precisamente ao redor do complexo de axonema-fibras densas exteriores subjacentes. O SMR tem a forma de malha cilíndrica que suporta a bainha mitocondrial sobrejacente.

A migração distal do *annulus* da espermátide para o flagelo define o comprimento da peça intermediária e, simultaneamente, as mitocôndrias movem-se para assumir a sua posição ao redor dos elementos estruturais da peça intermediária (Phillips, 1974; Rawe et al., 2007). Então, um mecanismo estrutural para segmentar a bainha mitocondrial da peça intermediária em formação seria a falta dos elementos do SMR, visto que estes estão ligados tanto ao *annulus* como as mitocôndrias durante a posterior migração do *annulus* (Olson e Winfrey, 1986).

A interação das mitocôndrias com os componentes do citoesqueleto é essencial para o movimento e fixação da mitocôndria dentro da célula, a ausência destes componentes compromete o desenvolvimento da peça intermediária (Olson e Winfrey, 1990; Sun e Yang, 2010; Zhang et al., 2012). Sun e Yang (2010) sugeriram que na espermiogênese, os transportes intramanchete e intraflagelar poderiam estar envolvidos na migração da mitocôndria na peça intermediária. Ambos são motores moleculares associados a cargas (polaridade) e se movimentam ao longo do citoesqueleto, sendo a manchete uma estrutura transitória que desaparece quando se completa a formação da espermátide e o transporte intraflagelar consiste num transporte motor associado a microtúbulos e fibras de actina, os quais utilizam proteínas adaptadoras como intermediários, tais como a Kinesina II, dineína, miosina Va, mas ainda não está claro a interação, regulação, transporte e função específica destes mecanismos.

No momento, diversas proteínas têm sido associadas ao desenvolvimento do flagelo, tais como, Gopc (Suzuki-Toyota et al., 2004), Nectin-2 (Bouchard et al., 2000), Sepp1 (Olson et al., 2005), o complexo T (Pilder et al., 1997), KLC3 (Zhang et al., 2012), SPERGEN1 (Doiguchi et al., 2002) e GPx4 (Suzuki-Toyota et al., 2007). A falta destas proteínas foi associada a espermatozoides com peça intermediária anormal. Assim, Djureinovic et al. (2014) afirmaram que o testículo é o tecido com mais genes diferentemente expressos do corpo em comparação com outros tecidos, chegando a cerca de 1000 genes expressos, porém a maioria desses genes e proteínas ainda é pouco caracterizada em termos de localização e função. Falhas nos padrões de expressão gênica ou de produção de proteínas podem promover anormalidades espermiáticas. Tais fatos demonstram que estes tipos de anomalias de peça intermediária podem ser de origem genética, mas a abordagem genética não será possível até que os genes envolvidos e o modo de herança sejam totalmente compreendidos (Rawe et al., 2007).

Cabe ressaltar que as patologias de peça intermediária refletem diretamente na fertilidade e têm sido relatadas em diferentes espécies. Espermatozoides com este tipo de anomalia apresentam baixa motilidade (Blom, 1959; Koefoed-Johnson et al., 1980), alta ocorrência de peroxidação lipídica (Rao et al., 1989) ou produção de EROs (Bulkeley e Meyers, 2018), e fragmentação do DNA (Morrell et al., 2008; Speyer et al., 2010), o que, conseqüentemente, compromete o desenvolvimento embrionário (Rawe et al., 2007; Ugajin et al., 2010) e leva a baixa fertilidade e até infertilidade.

Estudos em humanos com astenospermia demonstraram que os espermatozoides desses indivíduos apresentavam o comprimento de peça intermediária significativamente menor, além de menor número de giros e mitocôndrias. Nesta condição, a baixa motilidade dos espermatozoides estava relacionada à redução da capacidade de gerar energia (Mundy et al., 1995; Sun e Yang, 2010). Em outros estudos, Guraya (1987) e Silva et al. (2007) verificaram que as mitocôndrias de espermatozoides criopreservados podem apresentar desarranjo estrutural e vacuolização, que podem estar relacionados à baixa motilidade espermiática pós descongelamento, ressaltando a grande importância das mitocôndrias na viabilidade, motilidade e fertilidade dos espermatozoides (Peña et al., 2015). Um parâmetro considerado como um potencial regulador e indicador da motilidade e



fertilidade dos espermatozoides é o potencial de membrana mitocondrial, o qual indica a funcionalidade e integridade das mitocôndrias. Na atualidade existem diferentes sondas e metodologias para sua avaliação (Srivastava e Pande, 2016; Moscatelli et al., 2017).

Considerações finais

Ejaculados com alta patologia, em especial de peça intermediária, geralmente apresentam baixa motilidade espermática progressiva e vigor espermático. Este quadro pode ser causado por uma espermiogênese imperfeita, afetando diretamente a fertilidade. No entanto, pouco se conhece sobre a base genética das anormalidades de peça intermediária dos espermatozoides, embora tenham sido relatadas como características hereditárias recessivas, representando risco para as raças bovinas. Não obstante, patologias específicas de peça intermediária em espermatozoides bovinos ainda carecem de estudos para sua identificação e avaliação, tanto a nível estrutural quanto molecular, tais como abordagens proteômica e genômica.

Agradecimentos

Os autores agradecem a CAPES, CNPq e FAPEMIG.

Referências

- Aitken RJ, Nixon B, Lin M, Koppers A, Lee YH, Baker M.** Proteomic changes in mammalian spermatozoa during epididymal maturation. *Asian J Androl*, v.9, p.554-564, 2007.
- Amaral A, Lourenço B, Marques M, Ramalho-Santos J.** Mitochondria functionality and sperm quality. *Reproduction*, v.146, p.163-174, 2013.
- Attia S, Katila T, Andersson M.** The Effect of Sperm Morphology and Sire Fertility on Calving Rate of Finnish Ayrshire AI Bulls. *Reprod Domest Anim*, v.51, p.54-58, 2016.
- Barth AD, Oko RJ.** Abnormal morphology of bovine spermatozoa Ames: Iowa State University Press; 1989. 285p.
- Bedford JM, Calvin HT.** Changes in -S-S- Linked Structures of the Sperm Tail during Epididymal Maturation, with Comparative Observations in Sub-mammalian Species. *J Exp Biol*, v.187, p.181-204, 1974.
- Blom E.** A rare sperm abnormality: “Corckscrew-sperm” associated with sterility in bulls. *Nature*, v.183, p.1280-1281, 1959.
- Blom E.** Ultrastructure of some characteristic sperm defects and a proposal for a new classification of the bull spermogram. *Nord Vet Med*, v.25, p.383-391, 1973.
- Bouchard MJ, Dong Y, Mcdermott BM Jr, Lam DH, Brown KR, Shelanski M, Bellve AR, Racaniello VR.** Defects in nuclear and cytoskeletal morphology and mitochondrial localization in spermatozoa of mice lacking nectin-2, a component of cell-cell adherens junctions. *Mol Cell Biol*, v.20, p.2865-2873, 2000.
- Bulkeley EA, Meyers SA.** Novel Use of Imaging Flow Cytometry to Characterize the Relationship Between Abnormal Sperm Morphologies and Reactive Oxygen Species (ROS) in Stallion Sperm. *J Equine Vet Sci*, v.66, p.45, 2018.
- Calvin HI, Cooper GW, Wallace E.** Evidence That Selenium in Rat Sperm Is Associated With a Cysteine-Rich Structural Protein of the Mitochondrial Capsules. *Gamete Res*, v.4, p.139-149, 1981.
- Chenoweth PJ.** Genetic sperm defects. *Theriogenology*, 64, n.3, p.457-468, 2005.
- Chenoweth PJ, Burgess GW.** Mid-piece abnormalities in bovine semen following ephemeral fever. *Aust Vet J*, v.48, p.37-38, 1972.
- Chenoweth PJ, Chase CC, Risco CA, Larsen RE.** Characterization of gossypol-induced sperm abnormalities in bulls. *Theriogenology*, 53, p.1193-1203, 2000.
- Djureinovic D, Fagerberg L, Hallström B, Danielsson A, Lindskog C, Uhlén M, Pontén F.** The human testis-specific proteome defined by transcriptomics and antibody-based profiling. *Mol Hum Reprod*, v.20, p.476-488, 2014.
- Doiguchi M, Mori T, Toshimori K, Shibata Y, Iida H.** Spergen-1 might be an adhesive molecule associated with mitochondria in the middle piece of spermatozoa. *Dev Biol*, 252, p.127-137, 2002.
- Elfvin L-G.** An Ultrastructural Difference between the Outer and Inner Membrane of the Middle Piece Mitochondria in Rat Spermatozoa. *J Ultrastruct Res*, 24, p.259-268, 1968.
- Guraya SS.** Biology of Spermatogenesis and Spermatozoa in Mammals. 1 ed. Springer-Berlag, Berlin Heidelberg, p.275-276, 1987
- Ho H-C, Wey S.** Three Dimensional Rendering of the Mitochondrial Sheath Morphogenesis During Mouse Spermiogenesis. *Microsc Res Tech*, v.70, p.719-723, 2007.
- Johnson WH.** The significance to bull fertility of morphologically abnormal sperm. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*, v.13, p.255-270, 1997.



- Koefoed-Johnson HH, Andersen JB, Andresen E, Blom E, Philipsen H.** The DAG defect of the tail of the bull sperm: Studies on inheritance and pathogenesis. *Theriogenology*, v.14, p.471-475, 1980.
- Keyhani E, Storey BT.** Energy Conservation Capacity And Morphological Integrity Of Mitochondria In Hypotonically Treated Rabbit Epididymal Spermatozoa. *Biochim Biophys Acta*, v.305, p.557-569, 1973.
- 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.
- Moretti E, Suter G, Collodel G.** The importance of transmission electron microscopy analysis of spermatozoa: Diagnostic applications and basic research. *Syst Biol Reprod Med*, v.62, p.171-183, 2016.
- Morrell JM, Johannisson A, Dalin AM, Hammar L, Sandebert T, Rodriguez-Martinez H.** Sperm morphology and chromatin integrity in Swedish warmblood stallions and their relationship to pregnancy rates. *Acta Vet Scand*, v.50, p.2, 2008.
- Moscatelli N, Spagnolo B, Pisanello M, Lemma ED, De Vittorio M, Zara V, Pisanello F, Ferramosca A.** Single-cell-based evaluation of sperm progressive motility via fluorescent assessment of mitochondria membrane potential. *Sci Rep*, v.7, p.17931, 2017.
- Mundy AJ, Ryder TA, Edmonds DK.** Asthenozoospermia and the human sperm mid-piece. *Hum Reprod*, v.10, n.1, p.116-119, 1995.
- Olson GE, Hamilton DW.** Morphological changes in the midpiece of woolly opossum spermatozoa during epididymal transit. *Anat Rec*, v.186, p.387-403, 1976.
- Olson GE, Linck RW.** Observations of the structural components of flagellar axonemes and central pair microtubules from rat sperm. *J Ultrastruct Res*, v.61, p.21-43, 1977.
- Olson GE, Winfrey VP.** Identification of a Cytoskeletal Network Adherent to the Mitochondria of Mammalian Spermatozoa. *J Ultrastruct Mol Struct Res*, 94, n.2, p.131-139, 1986.
- Olson GE, Winfrey VP.** Mitochondria-cytoskeleton interactions in the sperm mid-piece. *J Struct Biol*, 103, n.1, p.13-22, 1990.
- Olson GE, Winfrey VP.** Structural organization of surface domains of sperm mitochondria. *Mol Reprod Dev*, v.33, p.89-98, 1992.
- Olson GE, Winfrey VP, Nagdas SK, Hill KE, Burk RF.** Selenoprotein P Is Required for Mouse Sperm Development. *Biol Reprod*, v.73, p.201-211, 2005.
- Pallini V, Bacci E.** Bull sperm selenium is bound to a structural protein of mitochondria. *J Submicrosc Cyt*, v.11, p.165-170, 1979.
- Peña FJ, Plaza Davila M, Ball BA, Squires EL, Martin Munoz P, Ortega Ferrusola C, Balao da Silva C.** The impact of reproductive technologies on stallion mitochondrial function. *Reprod Domest Anim*, v.50, p.529-537, 2015.
- Phillips DM.** Spermiogenesis. Academic Press, London, New York, 1974.
- Phillips DM.** Mitochondrial Disposition in Mammalian Spermatozoa. *J Ultrastruct Res*, v. 58, p.144-154, 1977.
- Pilder SH, Olds-Clarke P, Orth JM, Jester WF, Dugan L.** *Hst7*: A Male Sterility Mutation Perturbing Sperm Motility, Flagellar Assembly, and Mitochondrial Sheath Differentiation. *J Androl*, v.18, p.663-671, 1997.
- Ramalho-Santos J, Varum S, Amaral S, Mota PC, Sousa AP, Amaral A.** Mitochondrial functionality in reproduction: from gonads and gametes to embryos and embryonic stem cells. *Hum Reprod Update*, v.15, p.553-572, 2009.
- Rao B, Soufir JC, Martin M, David G.** Lipid peroxidation in human spermatozoa as related to midpiece abnormalities and motility. *Mol Reprod Dev*, v.24, p.127-134, 1989.
- Rawe VY, Hermes R, Nodar FN, Fiszbajn G, Chemes HE.** Results of intracytoplasmic sperm injection in two infertile patients with abnormal organization of sperm mitochondrial sheaths and severe asthenoteratozoospermia. *Fertil Steril*, v.88, p.649-653, 2007.
- Rocha A, Oliveira E, Vilhena MJ, Diaz J, Sousa M.** A novel apical midpiece defect in the spermatozoa of a bull without an apparent decrease in motility and fertility: A case study. *Theriogenology*, v.66, p.913-922, 2006.
- Silva AR, Fontenele-Neto JD, Cardoso RCS, Silva LDM, Chirinéa VH, Lopes MD.** Descrição de danos ultra-estruturais em espermatozoides caninos criopreservados. In: Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 17, 2007, Curitiba, PR. Anais. Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 2007. p.168.
- Speyer BE, Pizzey AR, Ranieri M, Joshi R, Delhanty JDA, Serhal P.** Fall in implantation rates following ICSI with sperm with high DNA fragmentation. *Hum Reprod*, v.25, p.1609-1618, 2010.
- Srivastava N, Pande M.** Mitochondrion: features, functions and comparative analysis of specific probes in detecting sperm cell damages. *Asian Pac J Reprod*, v.5, p.445-452, 2016.
- Sun X, Yang WX.** Mitochondria: transportation, distribution and function during spermiogenesis. *Adv Biosci Biotechnol*, v.1, p.97-109, 2010.
- Sutovsky P, Moreno RD, Ramalho-Santos J, Dominko T, Simerly C, Schatten G.** Ubiquitin tag for sperm mitochondria. *Nature*, v.402, p.371-372, 1999.
- Sutovsky P.** Biomarker based evaluation of bull fertility: Sperm phenotypes associated with molecular-level anomalies. In: XIX Curso Novos Enfoques Na Produção e Reprodução de Bovinos, Anais, Uberlândia, 2015.



- Suzuki-Toyota F, Ito C, Toyama Y, Maekawa M, Yao R, Noda T, Toshimori K.** The coiled tail of the round-headed spermatozoa appears during epididymal passage in GOPC-deficient mice. *Arch Histol Cyt*, v.67, p.361-371, 2004.
- Suzuki-Toyota F, Ito C, Toyama Y, Maekawa M, Yao R, Noda T, Iida H, Toshimori K.** Factors Maintaining Normal Sperm Tail Structure During Epididymal Maturation Studied in Gopc $-/-$ Mice. *Biol Reprod*, v.77, p.71-82, 2007.
- Turner RM.** Tales From the Tail: What Do We Really Know About Sperm Motility? Review. *J Androl*, v.24, p.790-803, 2003.
- Ugajin T, Terada Y, Hasegawa H, Nabeshima H, Suzuki K, Yaegashi N.** The shape of the sperm midpiece in intracytoplasmic morphologically selected sperm injection relates sperm centrosomal function. *J Assist Reprod Genet*, v.27, p.75-81, 2010.
- Ursini F, Heim S, Kiess M, Maiorino M, Roveri A, Wissing J, Flohe L.** Dual function of the selenoprotein PHGPX during sperm maturation. *Science*, v.285, p.1393-1396, 1999.
- Veeramachaneni DNR.** Spermatozoal Morphology. In: Mckinnon AO, Squires EL, Vaala WE, Varner DD. *Equine Reproduction*. 2.Ed. Oxford, United Kingdom: Wiley, 2011.
- Woolley DM, Beatty RA.** Inheritance of Midpiece Length in Mouse Spermatozoa. *Nature*, v.215, p.94-95, 1967.
- Woolley DM.** The midpiece of the mouse spermatozoon: its form and development as seen by surface replication. *J Cell Sci*, v.6, p.865-879, 1970.
- Zhang Y, Ou Y, Cheng M, Shojaei Saadi H, Thundathil JC, Van Der Hoorn FA.** KLC3 is involved in sperm tail midpiece formation and sperm function. *Dev Biol*, v.366, p.101-110, 2012.
-