



# DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA  
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

## Vias metabólicas e funcionalidade de espermatozóides humanos.

Dissertação apresentada à Universidade de Coimbra para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biologia Celular e Molecular. O trabalho foi realizado sob a orientação científica do Professor Doutor João Ramalho-Santos (Universidade de Coimbra).

Carla Patrícia Rodrigues Paiva

2010



## Agradecimentos

Ao meu orientador Professor Doutor João Ramalho. A palavra “Obrigado” não chega... Ainda assim, obrigado por me estimular a crescer e a tentar ser cada vez melhor, pelos desafios e acima de tudo por um dia ter acreditado que valia a pena. Obrigado pela frontalidade e sinceridade, e acima e tudo, pela amizade. Obrigado pela enorme paciência com que me ajudou a dar os primeiros passos na ciência.

À Xana, obrigada pela confiança depositada desde o início. Pela exigência e rigor científico, que me ajudam a tentar ser melhor. Obrigado pelo enorme apoio e motivação. Pela sinceridade, amizade e compreensão. E também por ajudares a orientar os meus primeiros passos na ciência. Obrigada!

Ao Serviço de Reprodução Humana dos Hospitais da Universidade de Coimbra em particular à Professora Doutora Teresa Almeida Santos por me abrir as portas do serviço, permitindo que este trabalho fosse realizado.

À Ana Paula, obrigado pela enorme ajuda, principalmente pela motivação. Obrigado por me fazeres acreditar mesmo nos momentos mais difíceis e por estares sempre disponível para ajudar e ensinar. Pela crítica construtiva e pela amizade.

À Renata, Marta e Sofia por tantos momentos bem passados no laboratório, muitos risos e conversas. Obrigado pelo vosso apoio, incentivo, crítica e amizade.

Às restantes colegas do grupo de Biologia da Reprodução e Fertilidade Humana, Sandra, Paula Mota, Ana Sofia e Beatriz, pelo apoio, incentivo e discussão científica.

A todos aqueles que integram o Serviço de Reprodução Humana dos HUC e o laboratório de citogenética, por me acolherem, por me mimarem e pela constante boa disposição, que contribuíram para o meu bem-estar cada dia. Obrigado pelos muitos momentos e sorrisos.

À Dra Ana Isabel, por prestar todo o apoio que lhe foi possível, fazendo todos os esforços para permitir que o trabalho fosse desenvolvido nas melhores condições, e também por ser um exemplo de perseverança.

A todos os meus amigos, do curso de Biologia e não só, porque de alguma forma foram contribuindo para o meu desenvolvimento e bem-estar. Um obrigado

muito especial à Leonor, Teresa e Ana Sofia, pela amizade, apoio e partilha de tantos e tantos momentos. Também a vós, um pedido de desculpa por tantas ausências.

À Diana, André, Sofia, Nuno, Eduardo, Joana, obrigado pela amizade, motivação e muitos risos. Ao Dinis pela preocupação ainda que distante, pelas “orelhadas” e abraços. Ao Pedro G. por me ajudares a “descomplicar”, pelo teu sentido prático, amizade e muitos risos.

Aos meus colegas do mestrado de Biologia Celular e Molecular por partilharem esta paixão pela ciência de uma forma alegre, divertida e construtiva. Pelo espírito de grupo, amizade e motivação.

À Alda, por me teres mostrado da forma mais triste quão efémera pode ser a vida, e por me fazeres encará-la de uma maneira diferente. Por me ensinares a valorizar cada momento.

A todas aquelas com quem vivi na RRB ao longo destes anos, em especial, à Catarina, Ana Filipa e Vanda, que foram verdadeiras companheiras. Obrigado por tantos e tantos momentos vividos e partilhados no nosso lar em Coimbra.

A toda a minha família, por me encorajar e acreditar em mim, muitas vezes mais do que eu própria acredito, pela confiança que depositam em mim e me ajuda a tentar ser cada dia melhor. Pela união e boa disposição. Pela presença, sempre.

Aos meus pais, os meus heróis, porque a eles devo o que sou. Sem vós, o vosso apoio incondicional, a vossa constante presença, não seria possível. Obrigado por toda a força que me transmitis, por toda a compreensão em tantos momentos de ausência. Um dia, quando for grande, gostava de ser como vós!

Ao meu irmão, por seres o meu melhor amigo. Obrigado pela tua presença, sempre! Pelo apoio incondicional, pela força que me transmites, pela partilha desta paixão que é a ciência. Obrigado pela confiança, por acreditares em mim e me ajudares a acreditar.

À Cati, por seres praticamente uma irmã. Obrigada pela motivação, pela presença e amizade. Obrigado por teres contribuído verdadeiramente para o crescimento da família, da forma mais alegre e saudável.

Ao João Pedro. Por me acompanhares, incondicionalmente, neste que foi um ano de mudanças. Obrigado por tantos sorrisos, mesmo em momentos de maior ansiedade, por me dares a mão sempre que preciso de coragem para avançar.

Obrigado pela companhia e partilha, pela força e motivação. Obrigado por estares presente.

## Resumo

A correcta funcionalidade dos espermatozóides humanos depende de vários processos que necessitam de energia na forma da adenosina trifosfato (ATP). A mobilidade, por exemplo, é essencial para que o espermatozóide consiga alcançar e penetrar o gâmeta feminino. Por outro lado, a capacitação, processo em que ocorre activação de vias de sinalização intracelulares e fosforilação de proteínas, é essencial para que, posteriormente, possa ocorrer a exocitose das enzimas hidrolíticas contidas no acrossoma (reação acrossómica), permitindo ao espermatozóide penetrar a zona pelúcida do ovócito. Nas últimas décadas tem-se questionado a importância funcional das mitocôndrias na peça intermédia e qual a participação das duas principais vias metabólicas, glicólise e fosforilação oxidativa, na produção de ATP em espermatozóides de mamíferos. Por outro lado, embora esteja estabelecido que os espermatozóides sobrevivem durante dias no tracto reprodutor feminino, os estudos efectuados *in vitro* geralmente não vão além das 1-3 horas, não ultrapassando as 24 horas.

Neste trabalho foram estudados os efeitos de três temperaturas (4 °C, temperatura ambiente e 37 °C) na viabilidade dos espermatozóides e funcionalidade mitocondrial, ao longo do tempo. Foram também testados meios com diferentes substratos metabólicos (glicólise e/ou fosforilação oxidativa) e avaliados alguns parâmetros da funcionalidade de espermatozóides humanos ao longo do tempo, na tentativa de perceber melhor o controverso metabolismo destas células. Utilizaram-se inibidores metabólicos da glicólise (2-deoxy-D-glucose e iodoacetato) e da fosforilação oxidativa (cianeto de potássio) para tentar perceber qual o impacto destas vias na funcionalidade dos espermatozóides humanos.

Os resultados obtidos permitiram estabelecer a temperatura ambiente como sendo a melhor para a manutenção de espermatozóides humanos viáveis durante

vários dias. Mostraram ainda que uma amostra de espermatozóides pode manter-se viável, com elevado potencial de membrana mitocondrial (PMM) e com mobilidade progressiva, durante vários dias num meio sem substrato, parecendo indicar que o metabolismo endógeno é suficiente para a sua manutenção. No entanto, a presença de glucose (mas não de piruvato/lactato) teve um efeito positivo na manutenção da viabilidade/PMM e mobilidade progressiva de espermatozóides humanos em cultura durante 10 dias. Conclui-se assim que a utilização de culturas em suspensão pode constituir uma nova abordagem no estudo do metabolismo dos espermatozóides humanos a longo prazo, mimetizando o que acontece no tracto reprodutor feminino.

## Abstract

Human sperm depend on various processes that require adenosine triphosphate (ATP) for their proper function. Motility is one of the most important, without which sperm cannot reach and penetrate the oocyte. On the other hand, capacitation, the process by which the intracellular metabolic pathways become activated and proteins are phosphorylated, is essential for the posterior exocytosis of hydrolytic enzymes contained in the acrosome (acrosome reaction, allowing sperm spermatozoa to penetrate the zona pellucida). In the last decades, the functional relevance of mitochondria-containing sperm midpiece, as well as the relative importance of glycolysis and oxidative phosphorylation in sperm ATP production have been questioned. *In vitro* studies that have addressed these issues are commonly carried out for 1-3 hours (24 hours maximum) although it is known that mammalian sperm survive for days in the feminine reproductive tract.

In this study the effect of three different temperatures (4 °C, room temperature and 37 °C) in sperm viability and mitochondrial function were studied for extended periods of time. Different media with different metabolic substrates (for glycolysis and/or oxidative phosphorylation) were also tested and some sperm functional parameters were evaluated, in an attempt to understand the controversial metabolic nature of these cells. Furthermore, metabolic inhibitors were used to dissect the importance of those pathways on human spermatozoa functionality.

Our results allowed established room temperature as the best temperature to preserve viable human spermatozoa for various days. They also showed that a sperm sample can still be viable with a high mitochondrial membrane potential (MMP) and progressive mobility after various days in a medium without any exogenous substrate. This seems to indicate that sperm endogenous metabolism is sufficient for their functional maintenance. However the presence of glucose (but not pyruvate/lactate) in



the media had a very clear positive effect on sperm viability/MMP and progressive motility maintenance in cultures for up to 10 days, suggesting an important role for this substrate. Therefore, the use of suspension cultures should be envisioned as a new approach to study long term human sperm metabolism way, mimicking what happens in the female reproductive tract.

## Lista de Abreviaturas

**ACH** – Alfaclorohidrina

**ADN** – Ácido desoxirribonucleico

**ATP** – Adenosina trifosfato

**BSA** – Albumina sérica bovina

**Ca<sup>2+</sup>** – Ião cálcio

**DAPI** - 4,6 diamino-2-fenilindol

**DOG** – 2-Deoxi-D-glucose

**FIV** – Fertilização *in vitro*

**FIV** – Fertilização *in vitro*

**GAPDH** – Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase

**HUC** – Hospitais da Universidade de Coimbra

**IAA** - Iodoacetato

**IAA** – Iodoacetato

**ICSI** – Injecção intracitoplasmática de um espermatozóide

**IP** – Iodeto de propídio

**JC-1** – Iodeto de 5,5',6,6'-tetracloro-1,1',3,3' tetraetilbenzimidazolilcarbocianina

**KCN** – Cianeto de potássio

**OMS** – Organização Mundial de Saúde

**PBS** – Tampão salino de fosfato

**PMM** – Potencial de membrana mitocondrial

**TRA** - Técnicas de Reprodução Assistida

## Índice

Agradecimentos .....	I
Resumo.....	IV
Abstract .....	VI
Lista de Abreviaturas.....	VIII
Índice .....	IX
Capítulo 1 – Introdução.....	1
1. Introdução.....	2
1.1 O Espermatozóide - uma célula altamente especializada.....	2
1.1.1 Infertilidade masculina.....	6
1.1.2 Funcionalidade do espermatozóide humano.....	7
1.2 Vias metabólicas para obtenção de ATP .....	9
1.2.1 Glicólise .....	9
1.2.2 Fosforilação oxidativa .....	11
1.2.3 Inibidores metabólicos.....	13
1.3 Papel da glicólise e fosforilação oxidativa na mobilidade dos espermatozóides – uma questão controversa .....	14
1.4 Objectivos.....	19
Capítulo 2 – Materiais e Métodos.....	20
2. Materiais e Métodos .....	21
2.1 Materiais e Reagentes.....	21
2.1.1 Material biológico .....	21
2.1.2 Processamento das amostras .....	21
2.2 Culturas de espermatozóides humanos.....	22
2.2.1 Inibidores metabólicos.....	23
2.3 Parâmetros avaliados .....	23
2.3.1 Mobilidade dos espermatozóides .....	23
2.3.2 Viabilidade e potencial da membrana mitocondrial.....	23
2.3.2.1 Viabilidade.....	23
2.3.2.2 Potencial da membrana mitocondrial.....	24
2.3.3 Capacitação e Integridade do acrossoma .....	24
2.3.3.1 Capacitação .....	25
2.3.3.2 Integridade do acrossoma.....	25

## Vias metabólicas e funcionalidade de espermatozóides humanos

2.4 Análise estatística .....	26
Capítulo 3 – Resultados .....	27
3. Resultados .....	28
3.1 Efeito da temperatura na viabilidade dos espermatozóides .....	28
3.2 Comparação entre meios com diferentes substratos .....	29
3.2.1 Viabilidade e PMM .....	29
3.2.2 Mobilidade progressiva .....	31
3.2.3 Capacitação .....	32
3.2.4 Integridade do acrossoma .....	32
3.3 Efeitos de inibidores da glicólise .....	33
3.3.1 2-Deoxi-D-Glucose (DOG) .....	34
3.3.1.1 Viabilidade e PMM .....	34
3.3.1.2 Mobilidade progressiva .....	34
3.3.1.3 Capacitação .....	35
3.3.1.4 Integridade do acrossoma .....	36
3.3.2 Iodoacetato (IAA) .....	37
3.3.2.1 Viabilidade e PMM .....	37
3.3.2.2 Mobilidade progressiva .....	38
3.4 Efeitos do inibidor da fosforilação oxidativa .....	39
3.4.1 Cianeto de Potássio (KCN) .....	39
3.4.1.1 Viabilidade e PMM .....	40
3.4.1.2 Mobilidade progressiva .....	40
3.4.1.3 Capacitação .....	41
3.4.1.4 Integridade do acrossoma .....	42
3.5 Efeito combinado da inibição das duas vias .....	43
3.5.1 Viabilidade e PMM .....	43
3.5.2 Mobilidade progressiva .....	43
Capítulo 4 – Discussão .....	45
4. Discussão .....	46
4.1 Efeito da temperatura na manutenção da viabilidade espermática .....	46
4.2 Cultura de espermatozóides e metabolismo .....	47
4.3 Efeitos da adição de inibidores metabólicos .....	48
Capítulo 5 – Conclusões .....	53
5. Conclusões .....	54

Vias metabólicas e funcionalidade de espermatozóides humanos

Capítulo 6 – Bibliografia .....	56
6. Bibliografia .....	57

## **Capítulo 1 – Introdução**

## 1. Introdução

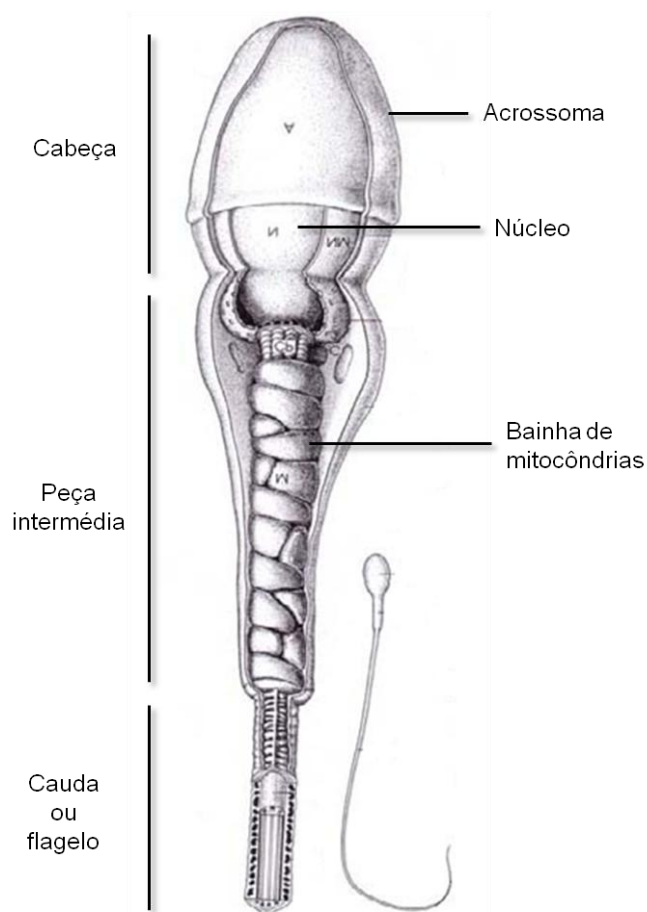
### 1.1 O Espermatozóide - uma célula altamente especializada

O gâmeta masculino é o resultado final de um extenso processo de meiose e diferenciação celular, a espermatogénese, que ocorre nos túbulos seminíferos, no interior do testículo (Holstein *et al.*, 2003). Trata-se de um processo altamente regulado e coordenado, que depende de interacções parácrinas entre células somáticas e células germinais, e da regulação endócrina exercida pelo eixo hipotálamo-hipofisário (de Kretser *et al.*, 1998; Fox, 1999; Walker & Cheng, 2005).

A espermatogénese começa com uma célula diplóide da linha germinativa que sofre uma série de divisões e alterações, e termina numa célula haplóide, muito condensada e hidrodinâmica, com citoplasma compartimentalizado e especializado em termos de estrutura-função. Para tal ocorre remoção de grande parte dos organelos celulares e do citoplasma, restando apenas o essencial ao cumprimento das funções do espermatozóide enquanto gâmeta masculino (de Kretser *et al.*, 1998; Sutovsky e Gaurishankar, 2006).

No final da espermatogénese os espermatozóides encontram-se num estado imaturo. Ocorre então a sua libertação do epitélio dos túbulos seminíferos (espermiacção), sendo os gâmetas posteriormente armazenados no epidídimo, onde permanecem até ao momento da ejaculação (Cooper e Yeung, 2006; Cooper, 2007). É de resto neste mesmo órgão que os espermatozóides sofrem importantes alterações fisiológicas durante um processo de maturação que lhes confere mobilidade, e lhes permitirá, em última instância, alcançar o ovócito (de Kretser *et al.*, 1998; Holstein *et al.*, 2003).

O gâmeta masculino é composto por três regiões principais: a cabeça, a peça intermédia e a cauda, ou flagelo. (Fig. 1.1)



**Figura 1.1** – Representação esquemática de um espermatozóide humano. Adaptado de Holstein et al, 2003.

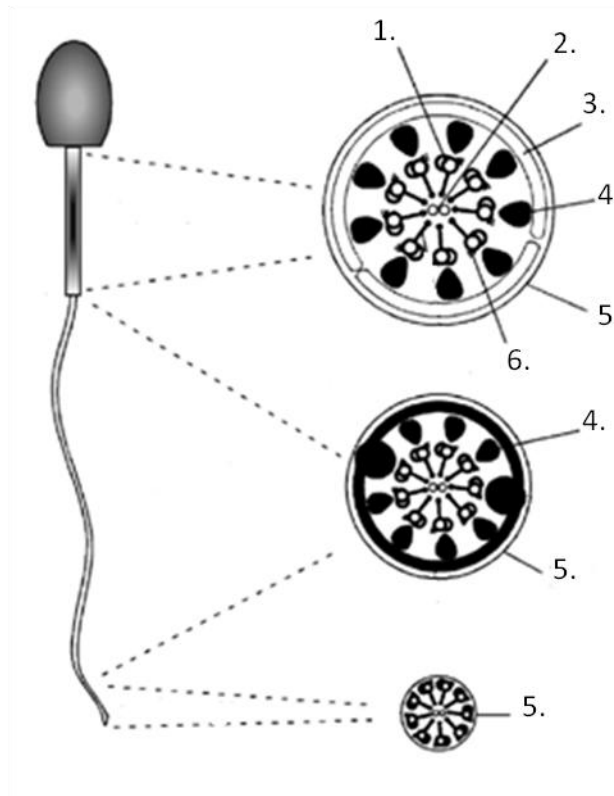
A cabeça do espermatozóide contém um núcleo haplóide, de volume muito inferior ao de uma célula somática. Durante a espermatogênese, para além do processo de meiose que reduz para metade o material genético do espermatozóide, ocorre também uma compactação da cromatina através de uma substituição parcial das histonas por proteínas de transição e, posteriormente, por protaminas (Brewer *et al.*, 2002; Meistrich *et al.*, 2003). As protaminas são proteínas mais pequenas que as histonas e formam um complexo ácido desoxirribonucleico (ADN)-protamina que é estabilizado por pontes dissulfeto aumentando deste modo o grau de compactação da cromatina e, conseqüentemente, o aerodinamismo da célula (Balhorn, 1982). Devido a este elevado grau de compactação do ADN nuclear acredita-se que os processos de



transcrição e tradução genética estão inactivos no espermatozóide (Ramalho-Santos *et al.*, 2007). Na região anterior da cabeça o espermatozóide possui uma vesícula designada acrossoma. Esta contém no interior enzimas hidrolíticas que são libertadas por exocitose (a chamada reacção acrossómica) aquando do contacto com a zona pelúcida do ovócito, hidrolisando-a, e permitindo ao espermatozóide penetrar essa camada protectora glicoproteica (Wassarman, 1999; Kierszenbaum, 2000; Miller *et al.*, 2002; Ramalho-Santos *et al.*, 2002).

A peça intermédia, localizada entre a cabeça e a cauda, é uma região especializada do espermatozóide, onde se organizam um número variável de mitocôndrias (22-75) que rodeiam de forma helicoidal a região anterior do flagelo (Ho e Wey, 2007; Ramalho-Santos *et al.*, 2007; 2009). A forma como estes organelos se organizam em conjunto com vários tipos de fibras e moléculas como a queratina, parece conferir resistência mecânica à estrutura, de forma a proteger as mitocôndrias de agressões exteriores, sugerindo um papel crucial das mesmas na funcionalidade do espermatozóide (Ramalho-Santos *et al.*, 2009).

A cauda ou flagelo, que confere mobilidade ao gâmeta masculino, é constituído por um axonema que contém o típico arranjo microtubular 9+2 de um flagelo eucariótico (9 pares de microtúbulos que rodeiam 2 microtúbulos centrais; Fig. 1.2), e pode dividir-se em peça principal e peça terminal (Turner, 2003). Na peça principal os dímeros microtubulares estão rodeados pela bainha fibrosa, uma estrutura citoesquelética específica do espermatozóide e por fibras densas exteriores, entre outras proteínas estruturais. As dineínas, ATPases associadas aos microtúbulos, hidrolisam a adenosina trifosfato (ATP) para gerar o movimento do flagelo (Lindemann *et al.*, 1992; Porter e Sale, 2000; Gagnon e de Lamirande, 2006; Kim *et al.*, 2007) e permitir a mobilidade do espermatozóide. Este processo é altamente dependente de ATP.



**Figura 1.2** – Representação esquemática da ultraestrutura do flagelo de um espermatozóide de mamífero. **1.** Duetos de microtúbulos; **2.** Par central de microtúbulos; **3.** Bainha de mitocôndrias; **4.** Fibras densas externas; **5.** Membrana plasmática; **6.** Braços de dineína. *Adaptado de Turner, 2003.*

Um espermatozóide humano morfologicamente normal é constituído por: uma cabeça oval (4-5  $\mu\text{m}$  de comprimento e 2,5-3,5  $\mu\text{m}$  de largura) com um acrossoma bem definido que compreende 40-70% da área anterior da cabeça; uma peça intermédia sem vestígios citoplasmáticos (7-8  $\mu\text{m}$  de comprimento e diâmetro relativamente superior ao da cauda); uma cauda recta, uniforme e desenrolada (aproximadamente 45  $\mu\text{m}$  de comprimento) (WHO, 1999).

### 1.1.1 Infertilidade masculina

Os casos diagnosticados de infertilidade humana (incapacidade de concepção após um ano de relações sexuais desprotegidas) têm aumentado ao nos últimos tempos, com um registo de mais ou menos o mesmo número de casos de infertilidade de base masculina, feminina e idiopática (isto é, quando a causa permanece por esclarecer; Skakkebaek *et al*, 2006). Como consequência, o recurso a técnicas de reprodução assistida (TRA) tem tido um aumento paralelo. Dentro destas técnicas, a fertilização *in vitro* (FIV), em que espermatozóides são colocados em contacto com ovócitos não fertilizados *in vitro*, para facilitar a fertilização (Lopata *et al.*, 1978); e a injeção intracitoplasmática de um espermatozóide (ICSI), processo de micromanipulação em que um espermatozóide é seleccionado e injectado dentro do ovócito (Palermo *et al.*, 1992), têm sido as mais utilizadas (Andersen *et al.*, 2008).

O diagnóstico da infertilidade masculina é normalmente efectuado através de uma análise seminal de rotina estandardizada, designada espermograma. Os parâmetros analisados, e os respectivos valores de referência, são estabelecidos pela Organização Mundial de Saúde (OMS/WHO). Nesta avaliação destacam-se três parâmetros fundamentais para definir uma amostra como sendo normal (normozoospermica): a concentração (uma amostra terá de ter  $\geq 20 \times 10^6$  espermatozóides/mL ejaculado); a morfologia ( $\geq 15\%$  formas normais, de acordo com os critérios de Kruger *et al*, 1986); e a mobilidade ( $\geq 50\%$  espermatozóides com mobilidade progressiva). Se cada um destes três parâmetros estiver abaixo do seu valor de referência, a amostra é classificada como oligo-, terato- ou asteno- zoospermica, respectivamente (WHO, 1999). Em casos mais graves, o indivíduo pode ser diagnosticado com oligoastenoteratozoospermia, quando, como o nome indica, os três parâmetros mencionados apresentam valores abaixo do normal. Outras combinações são também possíveis, dependendo do diagnóstico (oligoteratozoospermia, astenoteratozoospermia, etc).

### 1.1.2 Funcionalidade do espermatozóide humano

Apesar da sua utilização rotineira em Andrologia e TRA, os critérios da OMS têm um valor preditivo limitado na determinação da funcionalidade/fertilidade de uma amostra (Sousa et al., 2009). Por este motivo, existem outros parâmetros que ajudam a avaliar a funcionalidade de um espermatozóide com maior rigor. No entanto, estes parâmetros não são rotineiramente avaliados por falta de standardização a nível mundial, e por implicarem acréscimos em termos de tempo e custos na análise.

Para assegurar a funcionalidade celular e a sua viabilidade, o espermatozóide tem de possuir uma membrana celular íntegra. Este parâmetro pode ser facilmente monitorizado por técnicas de coloração simples como a eosina-nigrosina, observável ao microscópio óptico, em que a eosina Y, corante nuclear vermelho, penetra apenas espermatozóides com membrana celular comprometida, e a nigrosina é utilizada como contrastante para a visualização das células viáveis (Ramalho-Santos *et al.*, 2007); ou através de ensaios com *kits* de viabilidade compostos por sondas fluorescentes (secção 2.3.2.1; Garner e Johnson, 1995; Ramalho-Santos *et al.*, 2007).

Outro aspecto importante na análise da funcionalidade de espermatozóides é a avaliação de eventos relacionados com a capacidade de fertilização. Quando os gâmetas masculinos são ejaculados não estão aptos a fertilizar um ovócito, e têm de sofrer uma série de alterações bioquímicas, fisiológicas e celulares, a que vulgarmente se dá o nome de capacitação, e que ocorre *in vivo* no tracto reprodutor feminino (Gadella e Visconti, 2006). Este fenómeno pode também ser induzido *in vitro* através de meios capacitantes que tentam mimetizar a composição electrolítica do fluido do oviducto. Na maioria dos casos estes meios são constituídos por um substrato energético (piruvato, lactato, glucose), uma fonte proteica (geralmente albumina sérica), bicarbonato de sódio e cálcio (Visconti e Kopf, 1998). Ao nível molecular a capacitação é um processo complexo e mal conhecido que se caracteriza pela activação de cascatas de sinalização intracelular, um aumento intracelular de AMP

cíclico, cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) e pH, alterações na fluidez membranar, com efluxo de colesterol, produção de espécies reactivas de oxigénio (ROS) e fosforilação de proteínas em resíduos de serina, treonina e, principalmente, tirosina (de Lamirande *et al.*, 1997a; de Lamirande e O'Flaherty, 2008; Gadella *et al.*, 2008; Abou-haila e Tulsiani, 2009; Wassarman, 2009; de Lamirande e Lamothe, 2010). A capacitação pode monitorizar-se através da detecção de proteínas fosforiladas em resíduos de tirosina, por imunocitoquímica (Ramalho-Santos *et al.*, 2007).

A capacitação está também relacionada com uma hiperactivação momentânea da mobilidade dos espermatozóides, alterando o seu movimento de relativamente linear e progressivo, para um movimento vigoroso, frenético e de elevada amplitude (Murad *et al.*, 1992; de Lamirande *et al.*, 1997b). A observação de espermatozóides em co-cultura com células epiteliais de trompas de Falópio parece indicar que a hiperactivação da mobilidade auxilia o espermatozóide a progredir neste tecido (Pacey *et al.*, 1995). Esta hiperactividade pode ser medida utilizando um sistema computadorizado de análise de espermatozóides (CASA) que avalia uma série de parâmetros específicos relacionados com a mobilidade, como por exemplo, a amplitude e a velocidade.

A capacitação é igualmente condição essencial para que ocorra reacção acrossómica (Florman *et al.*, 2008). Um espermatozóide funcional deve possuir um acrossoma íntegro até entrar em contacto com a zona pelúcida do ovócito, que desencadeará a reacção acrossómica (Wassarman, 1999). A presença e integridade do acrossoma de espermatozóides pode ser avaliada através do uso de aglutininas marcadas com um fluoróforo, que marcam o conteúdo acrossómico após permeabilização da membrana plasmática (Hinsch *et al.*, 1997; Ramalho-Santos *et al.*, 2007).

Por sua vez, a actividade mitocondrial também não é rotineiramente avaliada. Este organelo é importante não só pelas suas funções de suporte energético (Conley *et al.*, 2001), mas também por estar envolvido na sinalização intracelular (Brookes *et al.*, 2004; 2005) produção de ROS (Aitken e Bennetts, 2006; de Lamirande e O'Flaherty, 2008), e pelo facto de algumas das suas proteínas estarem envolvidas no processo de capacitação (Shivaji *et al.*, 2009). O potencial da membrana mitocondrial (PMM) está relacionado com a actividade mitocondrial (ver secção 1.2.2) e é por isso utilizado para avaliar essa mesma actividade. A monitorização do PMM é geralmente efectuada recorrendo à utilização de sondas lipofílicas catiónicas fluorescentes, de que é exemplo o Iodeto de 5,5',6,6'-tetracloro-1,1',3,3' tetraetilbenzimidazolilcarbocianina (JC-1) (Amaral e Ramalho-Santos, 2010).

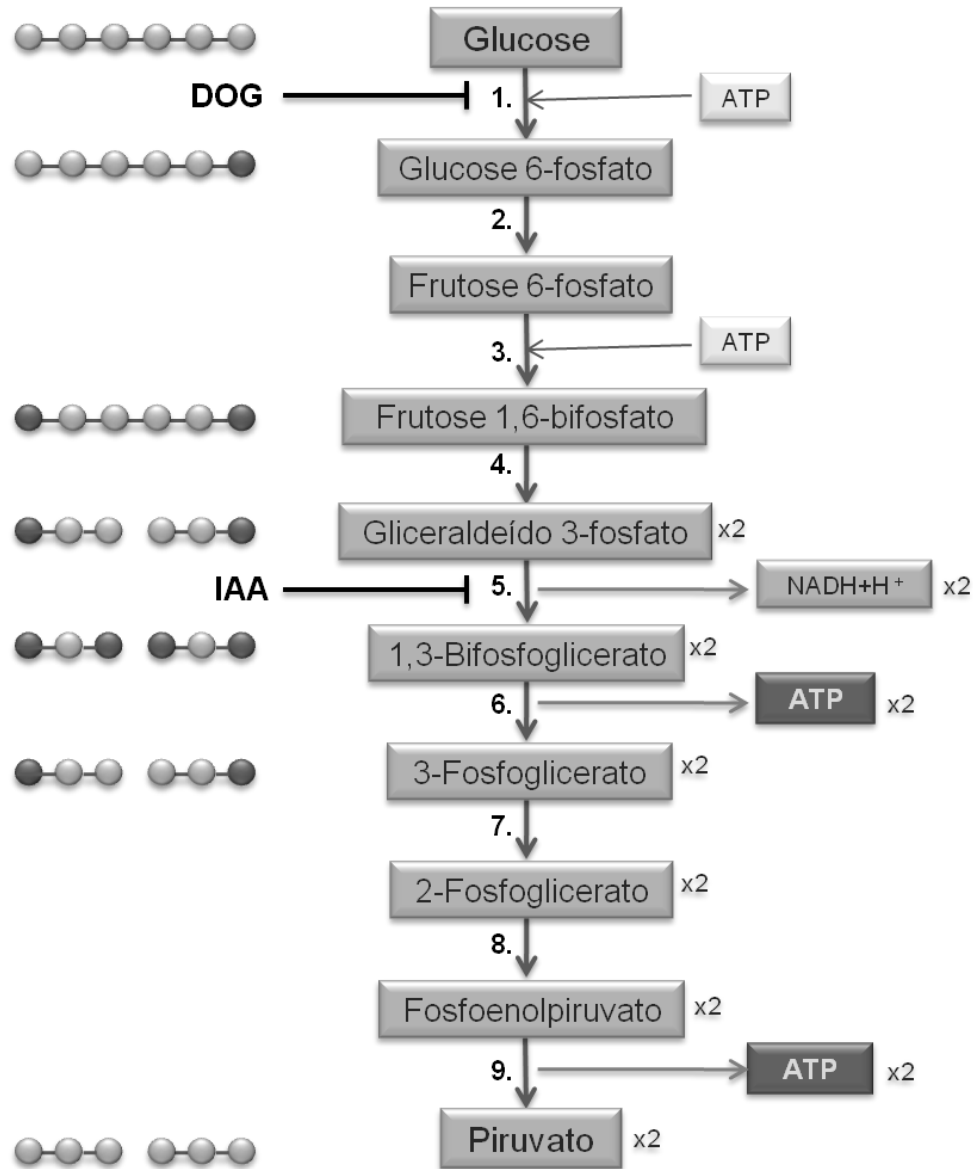
## **1.2 Vias metabólicas para obtenção de ATP**

As células humanas necessitam de energia na forma de ATP para crescerem, para se diferenciarem e para sustentarem inúmeras funções fisiológicas de que depende a sua viabilidade (Venkatesh *et al.*, 2009). Duas das principais vias de obtenção de energia nas células eucarióticas são a glicólise e a fosforilação oxidativa (Nelson e Cox, 2004).

### **1.2.1 Glicólise**

Na glicólise uma molécula de glucose é degradada através de uma série de reacções catalisadas por enzimas específicas em duas moléculas de piruvato, cada uma com três carbonos, e com potencial energético elevado (Fig. 1.3). No processo glicolítico alguma da energia livre libertada pela glucose é convertida em ATP, através de fosforilações ao nível do substrato, resultando num rendimento *net* de duas

moléculas de ATP. Alguma da energia livre é também transferida para dinucleótidos de nicotinamida ( $\text{NAD}^+$ ) e armazenada na sua forma reduzida ( $\text{NADH}$ ) (Nelson and Cox, 2004).



**Figura 1.3** – Esquema representativo da glicólise. ● representa o número de carbonos fosforilados. Enzimas: 1. Hexocinase; 2. Fosfoglicose isomerase; 3. Fosfofrutocinase-1; 4. Aldolase; 5. Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase; 6. Fosfoglicerato cinase; 7. Fosfoglicerato mutase; 8. Enolase; 9. Piruvato cinase. Inibidores: DOG – 2-Deoxi-D-Glucose; IAA – Iodoacetato. *Adaptado de Nelson and Cox, 2004.*

A glicólise ocorre no citoplasma das células eucarióticas e divide-se em duas fases: uma fase preparatória, em que ocorrem fosforilações e a clivagem de um açúcar com seis carbonos em duas moléculas com três carbonos; e uma segunda fase, em que ocorre o ganho energético de duas moléculas de ATP por cada molécula de glucose inicial. Este processo culmina com a síntese de piruvato, que, por sua vez, pode seguir geralmente uma de duas vias. Na via anaeróbica há formação de lactato através da reacção reversível catalisada pela lactato desidrogenase (LDH), regenerando deste modo  $\text{NAD}^+$  a partir de NADH (permitindo, assim, a continuação da glicólise em condições anaeróbicas). Na via aeróbica o piruvato é incorporado no ciclo de Krebs (que tem lugar no interior da mitocôndria) na forma de acetil-coenzima A (Nelson e Cox, 2004).

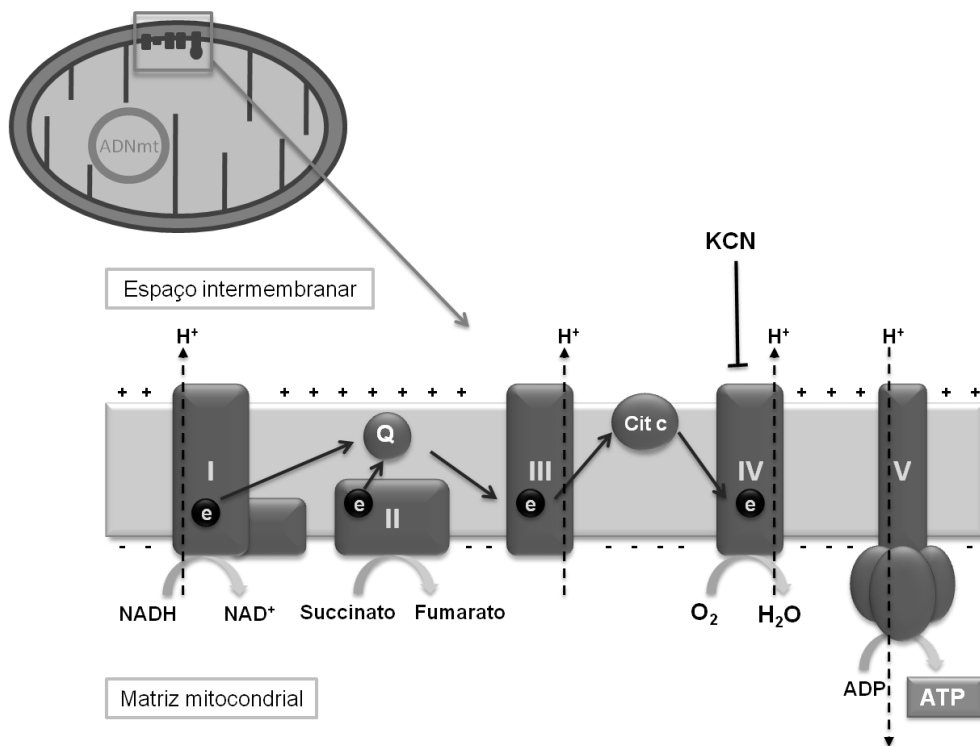
A especificidade das enzimas glicolíticas permite uma boa caracterização desta via metabólica e a possibilidade de execução de estudos para avaliar a importância da mesma na bioenergética celular, através do uso de inibidores específicos (Nelson e Cox, 2004).

### **1.2.2 Fosforilação oxidativa**

A mitocôndria tem um papel central na bioenergética celular. É neste organelo de dupla membrana que ocorrem tanto o ciclo de Krebs como a fosforilação oxidativa, tornando-a a maior fonte de ATP para a maioria das células eucarióticas (Wallace *et al.*, 1999). Este organelo tem um conjunto de complexos proteicos (I-IV) na sua membrana interna que constituem a cadeia transportadora de electrões (Fig. 1.4). Estes complexos possuem componentes redox anisotropicamente organizados, onde ocorre uma transferência de electrões cedidos por equivalentes redutores (NADH) ou pelo succinato (via  $\text{FADH}_2$ ), até ao aceitador final de electrões,  $\text{O}_2$ , originando água. Os complexos I, III e IV funcionam como bombas protónicas que utilizam a força



eléctrica gerada pela passagem de electrões para fazer um transporte vectorial de protões ( $H^+$ ) da matriz mitocondrial para o espaço intermembranar, criando um gradiente electroquímico, e gerando o potencial de membrana mitocondrial (PMM). O potencial electroquímico leva a que o regresso dos  $H^+$  ao interior da matriz ocorra de uma forma termodinamicamente favorável, criando um influxo de  $H^+$  através da ATP sintetase (complexo V) que proporciona a energia necessária à síntese de ATP. Este processo não só é altamente eficiente na produção de ATP (quinze vezes mais que a glicólise anaeróbica) como também pode utilizar uma maior variedade de substratos (Nelson e Cox, 2004).



**Figura 1.4** – Representação esquemática dos vários complexos envolvidos na fosforilação oxidativa (complexo I-IV e complexo V ou ATPsintetase). NADH– Nicotidamida adenina dinucleótido, forma reduzida; NAD+– Nicotinamida adenina dinucleótido, forma oxidada; Q – Ubiquinona; Cit c – Citocromo c;  $e^-$  – electrão;  $H^+$  – protão; ADP – Adenosina difosfato; ATP – Adenosina trifosfato. Inibidor: KCN- Cianeto de potássio. *Adaptado de Ramalho-Santos et al., 2009.*

### 1.2.3 Inibidores metabólicos

Os inibidores metabólicos são moléculas que interferem com a catálise abrandando ou travando reacções enzimáticas específicas (embora essa especificidade possa não ser absoluta), sendo por isso uma valiosa ferramenta no estudo de determinado mecanismo enzimático e na avaliação da importância de algumas vias metabólicas na funcionalidade celular. Estes inibidores dividem-se em dois grandes grupos, consoante a interacção que têm com a enzima afectada: inibidores enzimáticos reversíveis ou irreversíveis. Os inibidores reversíveis podem ser competitivos (competem com o substrato pelo local activo da enzima), não competitivos (ligam a um local diferente do local de ligação ao substrato), ou mistos. Os inibidores irreversíveis, por oposição, são aqueles que bloqueiam ou destroem um grupo funcional essencial para a actividade da enzima, impossibilitando-a de voltar a ser funcional (Nelson e Cox, 2004).

Para avaliar a importância da glicólise e da fosforilação oxidativa na funcionalidade dos espermatozóides de mamíferos é recorrente a utilização de inibidores da glicólise tais como a 2-deoxi-D-glucose (DOG) (Mukai e Okuno, 2004) ou o iodoacetato (IAA) (Witters e Foley, 1976); e da fosforilação oxidativa, como o cianeto de potássio (KCN; Hong *et al.*, 1983; Amaral e Ramalho-Santos, 2010).

A DOG é um análogo sintético da glucose, não metabolizável por possuir dois hidrogénios em vez de grupos hidroxil no carbono da segunda posição, inibindo a fosfohexoisomerase, enzima que converte a fosfoglucose em fosfofrutose, bloqueando por isso a glicólise no seu início (Kang e Hwang, 2006; Figura 1.3). O IAA é um inibidor irreversível da glicólise que bloqueia a acção da gliceraldeído desidrogenase (GAPDH) através de uma ligação covalente ao local activo da enzima, impedindo a síntese de ATP e de outros intermediários. O KCN por sua vez é um inibidor da citocromo c oxidase, complexo IV da cadeia transportadora de electrões mitocondrial, bloqueando a fosforilação oxidativa (Nelson e Cox, 2004).

### **1.3 Papel da glicólise e fosforilação oxidativa na mobilidade dos espermatozóides – uma questão controversa**

O espermatozóide é uma célula que necessita de grandes quantidades de energia para manter a sua funcionalidade. Eventos como a mobilidade (funcionamento das dineínas para movimentação dos microtúbulos do flagelo), a capacitação (fosforilação de resíduos de tirosina e activação de cascatas de sinalização celular), a reacção acrossómica (sinalização celular e exocitose), ou até a homeostase celular, são dependentes de ATP. O espermatozóide é, por isso, uma célula metabolicamente muito activa, produtora de grandes quantidades de energia, que lhe permitem sobreviver no tracto reprodutor feminino durante 3-5 dias (Gould *et al.*, 1984).

Uma das questões que se coloca no estudo do gâmeta masculino é qual será a proveniência do ATP dos espermatozóides ao longo do percurso até ao ovócito. Esta é uma questão controversa que tem sido alvo de um debate que dura há décadas, e discute sobretudo a preponderância de duas das principais vias metabólicas, glicólise e fosforilação oxidativa, na mobilidade dos espermatozóides.

No espermatozóide estas duas vias estão compartimentalizadas em duas regiões distintas: fosforilação oxidativa na peça intermédia, onde se localizam as mitocôndrias; e glicólise na cauda, onde estão presentes enzimas glicolíticas como gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH; Westhoff e Kamp, 1997), hexocinase 1 (Nakamura *et al.*, 2008; 2010) e fosfofrutocinase M, associadas à bainha fibrosa (Krisfalusi *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2007).

Embora a fosforilação oxidativa seja muito mais rentável (condições aeróbias) do que a glicólise (Nelson e Cox, 2004), existem algumas dúvidas relativamente à difusão do ATP produzido na peça intermédia, para todo o espermatozóide, incluindo a parte distal da cauda. Este pode ser um enorme problema para espécies com flagelos muito compridos, como é o caso dos roedores, mas também para os espermatozóides

humanos. Uma das formas propostas para ultrapassar esse obstáculo é a existência de sistemas de transporte de energia que auxiliem na difusão do ATP produzido na mitocôndria para toda a célula, e devolvam à mitocôndria os produtos (adenosinadifosfato; ADP) necessários à produção de novo ATP (Ford, 2006). Nos espermatozóides de ouriço-do-mar, por exemplo, está descrita a existência de um transportador, que utiliza a fosfocreatina para a transferência de energia da mitocôndria até à região distal da cauda (Tombes e Shapiro, 1985). No entanto, em espermatozóides de mamíferos este tipo de transporte parece estar pouco desenvolvido ou até mesmo ausente (Ford, 2006). O facto de os níveis de oxigénio no tracto reprodutor feminino serem baixos (Fisher e Bavister, 1993), pode comprometer a rentabilidade da fosforilação oxidativa, questionando a preponderância desta via na produção do ATP utilizado na mobilidade dos espermatozóides.

No entanto, a funcionalidade mitocondrial parece estar correlacionada com a elevada ou baixa capacidade de fertilização (Gallon *et al.*, 2006). No espermatozóide o PMM (indicador da actividade da mitocôndria) bem como a actividade de enzimas como a citocromo c oxidase (COX) aumentam consideravelmente quando comparado com estádios anteriores da espermatogénese (de Martino *et al.*, 1979; Petit *et al.*, 1995). Adicionalmente, a mitocôndria possui o seu próprio ADN (ADNmt), que codifica subunidades de quatro dos cinco complexos da cadeia respiratória mitocondrial (Anderson *et al.*, 1981; Fernández-Silva, 2003). Qualquer mutação ou dano no ADNmt pode, por isso, provocar um incorrecto funcionamento da cadeia de transferência de electrões, uma deficiência na síntese de ATP e disfunção mitocondrial. Esta situação tem muitas vezes repercussões patológicas, incluindo diminuição da qualidade espermática (Wallace 1994; Wallace *et al.*, 1999; Jansen e Burton, 2004; St. John *et al.*, 2005; Nakada *et al.*, 2006; Rajender *et al.*, 2010). A expressão de algumas subunidades dos complexos da cadeia transportadora de electrões (Amaral *et al.*, 2007), bem como a sua actividade enzimática (Ruiz-Pesini *et al.*, 1998), parecem estar

relacionadas com a qualidade espermática em seres humanos. O tamanho significativamente mais pequeno das peças intermédias foi também correlacionado com a astenozoospermia (baixa mobilidade dos espermatozóides; Mundy *et al.*, 1995) indicando um possível relevo destes organelos na mobilidade de espermatozóides humanos.

Uma abordagem frequente no estudo da importância da fosforilação oxidativa na mobilidade dos espermatozóides consiste na elaboração de experiências *in vitro*, incubando espermatozóides em meios com drogas que inibem de forma específica e individualizada os complexos da cadeia respiratória (St John *et al.*, 2005). A utilização de rotenona (inibidor do complexo I) pareceu induzir numa diminuição da mobilidade e da quantidade de ATP presente em espermatozóides humanos (de Lamirande e Gagnon, 1992; Ruiz-Pesini *et al.*, 2000). A antimicina A (inibidor do complexo III) parece promover efeitos semelhantes em espermatozóides humanos (Ruiz-Pesini *et al.*, 2000) e de bovinos (Krzyzosiak *et al.*, 1999), bem como um decréscimo da quantidade de ATP na presença de glucose (Ford and Harrison, 1981b). A utilização de cianeto de potássio (inibidor do complexo IV) sugere também uma diminuição da mobilidade de espermatozóides humanos (Ruiz-Pesini *et al.*, 2000), à semelhança do que acontece com o bloqueio directo da ATP sintetase pela oligomicina (Sutre *et al.*, 1979; Ruiz-Pesini *et al.*, 2007).

Por outro lado, alguns trabalhos indicam que na presença de substratos glicolíticos é possível a manutenção dos níveis celulares de ATP e da mobilidade em espermatozóides humanos, e que estes parâmetros diminuem rapidamente na sua ausência (Peterson and Freund, 1969; 1970; 1971), sugerindo a importância da glicólise nestes eventos.

Outros estudos descrevem que a presença de glucose no meio parece ser essencial para a hiperactivação da mobilidade de espermatozóides humanos (Hoshi *et*

*al.*, 1991; Williams e Ford, 2001; Nascimento *et al.*, 2008), e que a sua ausência resulta numa diminuição de alguns parâmetros associados à mobilidade (avaliados por CASA; Nascimento *et al.*, 2008) e das taxas de fertilização *in vitro* (Mahadevan *et al.*, 1997).

À semelhança do que acontece para a fosforilação oxidativa, no estudo da importância da glicólise na mobilidade é recorrente a utilização de inibidores específicos de enzimas glicolíticas. A utilização de 6-cloro-6-deoxiaçúcares revelou ter efeitos contraceptivos por inibição da mobilidade de espermatozóides de rato (Ford e Waites, 1978; Ford e Harrison, 1981a). Alguns estudos indicam que a presença de DOG causa uma depleção na quantidade de ATP que compromete a funcionalidade dos espermatozóides, inibindo a mobilidade (Hyne e Edwards, 1985; Mukai e Okuno, 2004). Trabalhos realizados com uma variedade de compostos derivados de cloro, como a  $\alpha$ -clorohidrina (inibidor da GAPDH) revelaram um decréscimo da mobilidade e das quantidades de ATP nos espermatozóides de mamíferos, na presença de glucose, indicando que estes compostos poderiam ser bons candidatos a contraceptivos masculinos (Ford e Harrison, 1985; 1986; Bone *et al.*, 2001). A utilização de um desacoplador da cadeia respiratória, pentaclorofenol (PCP) em espermatozóides de primatas pareceu não ter qualquer efeito no perfil metabólico, analisado por espectroscopia de ressonância magnética nuclear (NMR; Lin *et al.*, 2009). Estes resultados foram interpretados como indicadores de uma maior importância da via glicolítica na manutenção dos níveis de ATP. A utilização de IAA também parece provocar uma diminuição drástica da mobilidade de espermatozóides de suíno (Witters e Foley, 1976).

Os resultados de experiências efectuadas com espermatozóides retirados do epidídimo de ratinhos, incubados em diferentes meios e com inibidores da fosforilação oxidativa ou da glicólise, parecem indicar que ambas as vias são capazes de sustentar

a mobilidade dos espermatozóides, embora a glicólise tenha um papel predominante (Mukai e Okumo, 2004).

Uma abordagem diferente no estudo do metabolismo dos espermatozóides tem sido a criação de ratinhos *knock-out* (KO) para enzimas específicas presentes nos espermatozóides (Yan, 2009). A criação de ratinhos KO para a enzima glicolítica GAPDH-S (específica do testículo) revelou que estes eram inférteis e apresentavam espermatozóides com baixos níveis de mobilidade e ATP, embora sem alterações na actividade mitocondrial (Miki *et al.*, 2004). Outro modelo de ratinho KO para fofoglicerato cinase 2 (PGK2; isoforma específica da enzima glicolítica que catalisa o primeiro passo de produção de ATP, e que é expressa apenas durante a espermatogénese) parece afectar a mobilidade e ao níveis de ATP dos espermatozóides dos ratinhos, embora com menor impacto que o KO da GAPDH-S (Danshina *et al.*, 2010). O KO da enzima glicolítica lactato desidrogenase-C<sub>4</sub> (LDH-C<sub>4</sub>), normalmente expressa em células espermatogénicas, resultou também num decréscimo da mobilidade e dos níveis de ATP dos espermatozóides bem como da fertilidade destes ratinhos, em comparação com o grupo controlo (Odet *et al.*, 2008). Por outro lado, ratinhos KO para citocromo c<sub>T</sub> (a isoforma específica do testículo) revelaram-se férteis, embora com atrofia testicular. Ainda assim, os espermatozóides destes ratinhos mostraram-se menos móveis, com menores níveis de ATP e menores taxas de fertilização *in vitro* (Narisawa *et al.*, 2002). Embora estes resultados sejam interpretados por muitos como prova de que a glicólise é essencial para a mobilidade dos espermatozóides, esta interpretação continua a ser questionada (Ruiz-Pesini *et al.*, 2007; Storey, 2008). Por um lado, a glicólise necessita de ATP para ser iniciada, por outro as duas vias metabólicas discutidas, glicólise e fosforilação oxidativa, estão interligadas e a primeira é, muitas vezes, pré-requisito da segunda.

Este debate energético sobre o balanço das duas vias (glicolítica e oxidativa) na mobilidade dos espermatozóides parece estar longe de chegar a um consenso

(Ford, 2006; Ruiz-Pesini *et al.*, 2007; Storey, 2008; Ramalho-Santos *et al.*, 2009). Ainda assim, cada vez mais se acredita que esta é uma questão específica de cada espécie, dependente das condições (tipo de substrato metabólico disponível, quantidade de O<sub>2</sub>) do tracto reprodutor feminino (Ramalho-Santos *et al.*, 2009).

#### **1.4 Objectivos**

Embora seja sabido que os espermatozóides podem permanecer viáveis no tracto reprodutor feminino durante 3-5 dias (Gould *et al.*, 1984), os trabalhos realizados *in vitro* para avaliar o comportamento de espermatozóides em diferentes meios de cultura e na presença de diferentes tipos de substâncias potencialmente moduladoras, duram geralmente 1-3 horas, não ultrapassado as 24 horas. Tendo este facto como premissa, o presente trabalho teve como principal objectivo estabelecer as melhores condições para a manutenção *in vitro* de espermatozóides humanos viáveis numa escala temporal de dias, estabelecendo assim uma nova abordagem no estudo dos gâmetas masculinos.

O segundo objectivo deste trabalho foi utilizar o sistema de cultura de espermatozóides para obter informação sobre o metabolismo destas células e contribuir para o debate energético sobre a preponderância de duas das principais vias metabólicas envolvidas, a glicólise e a fosforilação oxidativa.



## **Capítulo 2 – Materiais e Métodos**

## **2. Materiais e Métodos**

### **2.1 Materiais e Reagentes**

Todos os reagentes e compostos químicos utilizados neste trabalho foram adquiridos através da Sigma (St. Louis, EUA), salvo exceções citadas ao longo do texto.

#### **2.1.1 Material biológico**

As amostras de sémen usadas neste trabalho foram obtidas por masturbação, após 3 a 5 dias de abstinência sexual, de indivíduos que recorreram ao Serviço de Reprodução Humana dos Hospitais da Universidade de Coimbra (HUC), com a finalidade de efectuar análises de rotina (espermogramas) ou técnicas de reprodução assistida (fertilização *in vitro* ou injeção intracitoplasmática de um espermatozóide). Todos os indivíduos assinaram formulários de consentimento informado e todo o material biológico foi utilizado de acordo com as directrizes do quadro interno de revisão fornecido pelos HUC.

#### **2.1.2 Processamento das amostras**

As amostras de sémen foram analisadas e categorizadas de acordo com parâmetros definidos pela Organização Mundial de Saúde (OMS; WHO, 1999). Os espermatozóides foram separados do plasma seminal e outras células através de uma centrifugação em gradiente de densidade, usando meio de isolamento e separação de espermatozóides ISolate® (Irvine Scientific, Santa Ana, EUA). Neste estudo utilizaram-se apenas amostras com concentração  $\geq 20 \times 10^6$  espermatozóides/mL e pelo menos

50% espermatozóides móveis, dois dos parâmetros que definem a normalidade de uma amostra de sémen.

## **2.2 Culturas de espermatozóides humanos**

Após o isolamento dos espermatozóides procedeu-se à elaboração de culturas celulares em suspensão, com uma concentração final de  $10 \times 10^6$  espermatozóides/mL em tubos de Falcon de 15 mL. Todos os meios tiveram como base uma solução tampão salina de fosfato (PBS, pH 7,2-7,4; GIBCO, Invitrogen, Paisley, Reino Unido) ao qual se adicionaram 0,1 g/L de cloreto de cálcio ( $\text{CaCl}_2$ ), 0,1 g/L de cloreto de magnésio ( $\text{MgCl}_2$ ), 10 mL/L de penicilina e estreptomicina (GIBCO) e 3 g/L de albumina sérica bovina (BSA).

Utilizaram-se 4 meios de cultura com diferentes substratos para diferentes vias metabólicas - glicólise e fosforilação oxidativa. Os 4 meios diferiram apenas no tipo de substrato: Meio 1 – meio controlo, sem qualquer substrato; Meio 2 – 5 mM de glucose; Meio 3 – 1 mM de piruvato e 10 mM de lactato; Meio 4 – 5 mM de glucose, 1 mM de piruvato e 10 mM de lactato. Todos os meios foram filtrados na câmara de fluxo laminar utilizando filtros com poros de 2  $\mu\text{m}$  de diâmetro, e foram sempre manipulados em condições de esterilidade.

Inicialmente, espermatozóides incubados no meio 1 foram mantidos a) numa incubadora a 37°C; b) num local escuro à temperatura ambiente; c) no frigorífico a 4°C. Após esse ensaio, todas as culturas foram mantidas à temperatura ambiente em condições aeróbias, num agitador, à velocidade mínima de agitação.

Os meios foram substituídos diariamente recorrendo a uma centrifugação (1400 xg durante 10 minutos). As culturas foram sempre manipuladas em condições de esterilidade no interior de uma câmara de fluxo laminar.

### **2.2.1 Inibidores metabólicos**

Utilizaram-se inibidores metabólicos da glicólise: 2-Deoxi-D-glucose (DOG) – 5 mM e Iodoacetato (IAA) – 10  $\mu$ M; e da fosforilação oxidativa: Cianeto de potássio (KCN) – 1 mM. Todos os inibidores foram testados em todos os meios e comparados com o controlo do respectivo meio, sem adição de inibidor.

## **2.3 Parâmetros avaliados**

### **2.3.1 Mobilidade dos espermatozóides**

A mobilidade foi avaliada diariamente utilizando um microscópio de contraste de fase e classificada segundo os critérios definidos pela OMS.

### **2.3.2 Viabilidade e potencial da membrana mitocondrial**

A viabilidade e o potencial da membrana mitocondrial (PMM) foram avaliadas simultaneamente por microscopia de fluorescência, nos 4 meios controlo 20 minutos após o início das culturas e posteriormente a cada segundo dia. Após uma incubação de 20 minutos a 37 °C com as sondas abaixo mencionadas, foram contados 100 espermatozóides por lâmina num microscópio de fluorescência Zeiss Axio Image (Carl Zeiss, Gotinga, Alemanha).

#### **2.3.2.1 Viabilidade**

A viabilidade dos espermatozóides foi avaliada através do uso de um kit de viabilidade (Live/Dead® Sperm Viability Kit; Molecular Probes, Eugene, EUA). Este kit é constituído por duas sondas fluorescentes que coram o núcleo consoante a integridade da membrana celular do espermatozóide. O SYBR-14, de fluorescência verde, marca qualquer núcleo, e o Iodeto de Propídio (IP), de fluorescência vermelha, apenas penetra nos núcleos dos espermatozóides com integridade membranar comprometida. Os espermatozóides foram incubados com as sondas nucleares em simultâneo a uma concentração final de 100 nM SYBR-14 e 240 nM IP. Observaram-se duas populações de espermatozóides: vivos, com fluorescência verde (SYBR-14) e mortos, com fluorescência vermelha (IP).

### **2.3.2.2 Potencial da membrana mitocondrial**

Em simultâneo foi avaliado o potencial da membrana mitocondrial com a sonda fluorescente Iodeto de 5,5',6,6'-tetracloro-1,1',3,3' tetraetilbenzimidazolilcarbocianina (JC-1; Molecular Probes). Na presença de baixo potencial de membrana mitocondrial este marcador encontra-se na sua forma monomérica, emitindo uma fluorescência verde, e na presença de um elevado PMM forma oligómeros que emitem uma fluorescência vermelha/laranja. Observaram-se três populações de espermatozóides: elevado PMM (marcação vermelha); baixo PMM (marcação verde); sem PMM (ausência de marcação).

### **2.3.3 Capacitação e Integridade do acrossoma**

Para avaliação da capacitação e da integridade do acrossoma dos espermatozóides,  $10 \times 10^6$  espermatozóides/mL foram fixados em 2% (v/v) de

formaldeído em PBS (pH 7,2) durante 40 minutos, após 30 minutos de adesão das células a lamelas. Depois da fixação, a membrana celular dos espermatozóides foi permeabilizada com 1% (v/v) Triton X-100 durante 20 minutos. Os espermatozóides foram mantidos pelo menos 30 minutos em solução de bloqueio (PBS com 1 mg/mL de BSA e 100 mM de glicina), e procedeu-se então à continuação do protocolo respectivo para detecção de capacitação e integridade do acrossoma.

### **2.3.3.1 Capacitação**

A capacitação dos espermatozóides foi avaliada pela detecção de proteínas fosforiladas em resíduos de tirosina por imunocitoquímica. Após o bloqueio procedeu-se a uma incubação *overnight* a 37°C com anticorpo primário policlonal anti-fosfotirosinas humanas, produzido em coelho (*Zymed*, São Francisco, EUA) diluído 1:10 em solução de bloqueio. Após uma lavagem de 30 minutos com 0,1% (v/v) Triton X-100 à temperatura ambiente, as amostras foram incubadas durante 1 hora a 37°C com anticorpo secundário anti-coelho produzido em cabra (IgG; Molecular Probes) com fluoróforo verde (Alexa Fluor 488) diluído em solução de bloqueio (1:200). Fez-se mais uma lavagem de 30 minutos com 0,1% (v/v) Triton X-100 à temperatura ambiente e as lamelas foram montadas numa lâmina com meio de montagem Antifade contendo o corante nuclear, 4,6 diamino-2-fenilindol (DAPI; Vector Labs, Burlingame, EUA). As lamelas foram seladas com verniz transparente e contaram-se 100 espermatozóides por lamela, no microscópio de fluorescência, calculando-se posteriormente a percentagem de espermatozóides marcados, com fluorescência verde.

### **2.3.3.2 Integridade do acrossoma**

Para avaliar a integridade do acrossoma recorreu-se ao ensaio PSA-FITC, uma aglutinina extraída da planta *Pisum sativum* ligada a isotiocianato de fluoresceína. Esta aglutinina liga-se ao conteúdo acrossómico, emitindo uma fluorescência verde quando o acrossoma se encontra íntegro. Os espermatozóides foram incubados a 37 °C durante 1 hora com 1 mg/mL de PSA-FITC em solução de bloqueio. Procedeu-se a uma lavagem de 30 minutos com 0,1% (v/v) Triton X-100 à temperatura ambiente e as lamelas foram montadas numa lâmina como descrito anteriormente. Foram observados 100 espermatozóides por lamela por microscopia de fluorescência e calculada a percentagem de espermatozóides com acrossoma íntegro.

#### **2.4 Análise estatística**

A análise estatística dos dados foi efectuada através da utilização do *SPSS* para *Windows* (versão 13, Chicago, EUA). A distribuição normal dos dados foi testada com o teste *Kolmogorov-Smirnov*. Foi utilizada ANOVA de uma via (ou o equivalente não paramétrico teste de *Kruskal-Wallis*, quando não se verificou distribuição normal dos dados) na comparação de resultados para os diferentes meios. A comparação entre os controlos e os diferentes inibidores foi feita utilizando o teste-*T Student's* para amostras independentes (ou o equivalente não paramétrico Mann-Whitney-test, quando os dados não apresentaram distribuição normal). Os resultados foram expressos como médias±erro-padrão e as diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando associadas a um valor de  $p < 0,05$ .

## Capítulo 3 – Resultados

Parte destes resultados encontra-se submetida para publicação: “*Long-term culture: A new approach in the study of human sperm metabolism*”, Amaral A.\*, Paiva C.\*, Baptista M., Sousa A.P. and Ramalho-Santos J.

\*Autoras com contribuição equivalente, devendo considerar-se co-Primeiras Autoras.

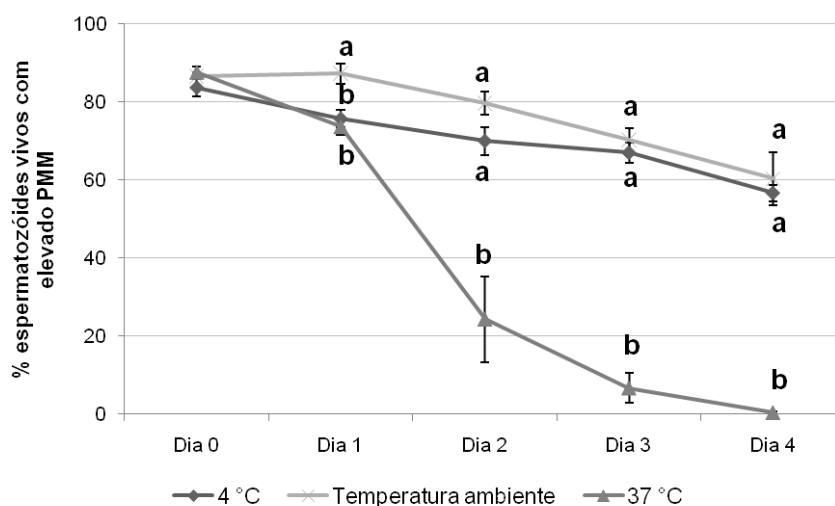


### 3. Resultados

#### 3.1 Efeito da temperatura na viabilidade dos espermatozóides

Com o objectivo de estabelecer as melhores condições para a manutenção de espermatozóides em meio de cultura, testou-se o efeito da temperatura na viabilidade (integridade membranar) e PMM. As amostras (n=5) foram mantidas num meio sem substrato, a três temperaturas diferentes: a) 4 °C; b) temperatura ambiente; c) 37 °C; e monitorizadas diariamente.

Os resultados (média ± erro-padrão) revelaram diferenças estatisticamente significativas a partir do dia 1 (Fig. 3.1), indicando que há um decréscimo acentuado da viabilidade dos espermatozóides a 37 °C, temperatura usada pela maioria dos estudos com espermatozóides. A incubação de espermatozóides a temperatura ambiente mostrou ser a mais adequada para manter os espermatozóides viáveis (60 ± 6,8 % após 4 dias), tendo sido esta a temperatura que apresentou um menor decréscimo relativamente ao dia 0.



**Figura 3.1** – Comparação entre a média de espermatozóides vivos (com membrana celular íntegra) e elevado PMM, durante quatro dias, a diferentes temperaturas. Os resultados representam o valor da média ± erro-padrão em percentagem de espermatozóides (n=5). *a* e *b* representam diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ).

### 3.2 Comparação entre meios com diferentes substratos

Após o estabelecimento da temperatura óptima para a manutenção de espermatozóides *in vitro* ao longo de vários dias, este sistema de cultura em suspensão foi utilizado para tentar perceber melhor o metabolismo dos gâmetas masculinos humanos.

Avaliou-se o comportamento de 23 amostras de espermatozóides na presença de substratos metabólicos para a glicólise (glucose) e/ou fosforilação oxidativa (piruvato e lactato). O meio sem substrato foi utilizado como controlo, de forma a avaliar o metabolismo endógeno. As culturas foram mantidas ao longo de vários dias, até atingirem um mínimo de 10% de viabilidade. Por esse motivo o número de amostras comparadas nem sempre foi o mesmo em cada dia (Tabela 3.1).

**Tabela I** – Número de total de amostras (n) analisado em cada dia em cada meio.

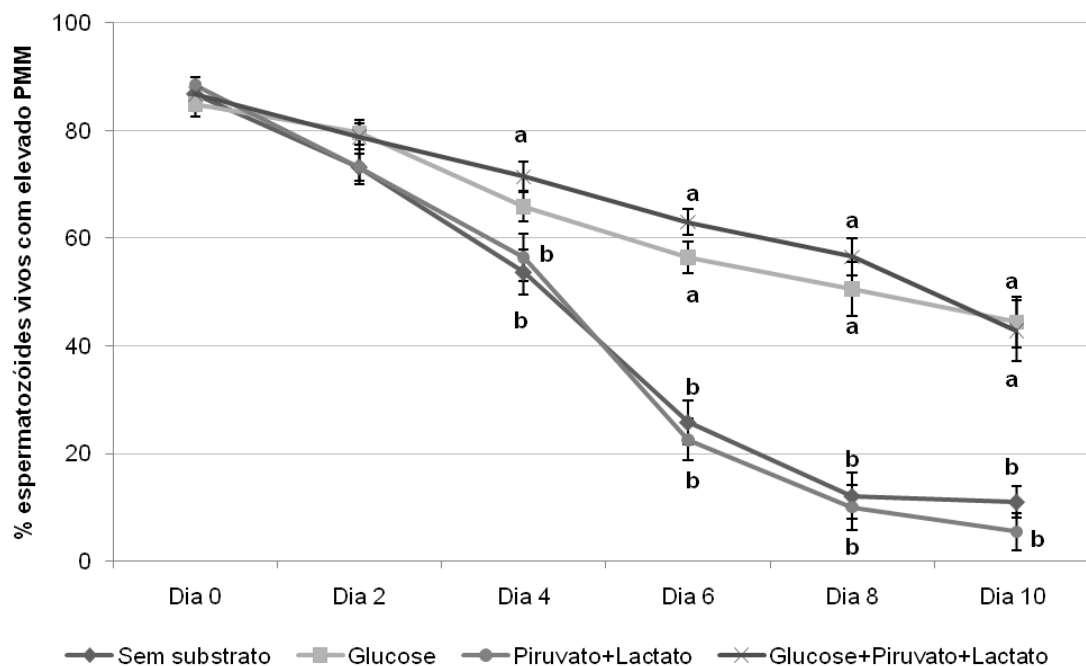
Meio	Dia										
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Sem substrato	23	23	23	23	22	20	18	14	9	2	2
Glucose	23	23	23	22	22	20	18	14	11	5	4
Piruvato + Lactato	23	23	23	23	22	20	18	14	10	2	2
Glucose + Piruvato + Lactato	23	23	23	23	22	20	18	14	11	5	4

#### 3.2.1 Viabilidade e PMM

Tal como esperado, a média da percentagem de espermatozóides viáveis com elevado PMM apresentou um decréscimo a cada segundo dia para todos os meios testados (Fig. 3.2). Ainda assim este declínio foi mais notório nos dois meios sem glucose, embora não se tenham observado diferenças estatisticamente

significativas entre os diferentes meios antes do dia 4. Os meios com glucose foram aqueles em que existiu uma maior percentagem de espermatozóides viáveis e com mitocôndria activa (elevado PMM) no dia 10 (meio com glucose e com os três substratos:  $42,8 \pm 5,6\%$  e  $44,4 \pm 4,6\%$ , respectivamente; meio sem substratos:  $11,0 \pm 3,0$ ; meio com piruvato e lactato:  $5,5 \pm 3,5\%$ ).

Na comparação entre os meios com glucose, a presença de piruvato e lactato pareceu aumentar ligeiramente a sobrevivência dos espermatozóides. No dia 4 observaram-se diferenças estatisticamente significativas na comparação entre o meio com os três substratos e os dois meios sem glucose (meio sem substrato e meio com piruvato e lactato). A partir do dia 6 registaram-se diferenças estatisticamente significativas entre os meios com e sem glucose. O meio sem substrato e o meio com piruvato e lactato tiveram aparentemente o mesmo impacto na viabilidade dos espermatozóides, não revelando qualquer diferença entre eles.

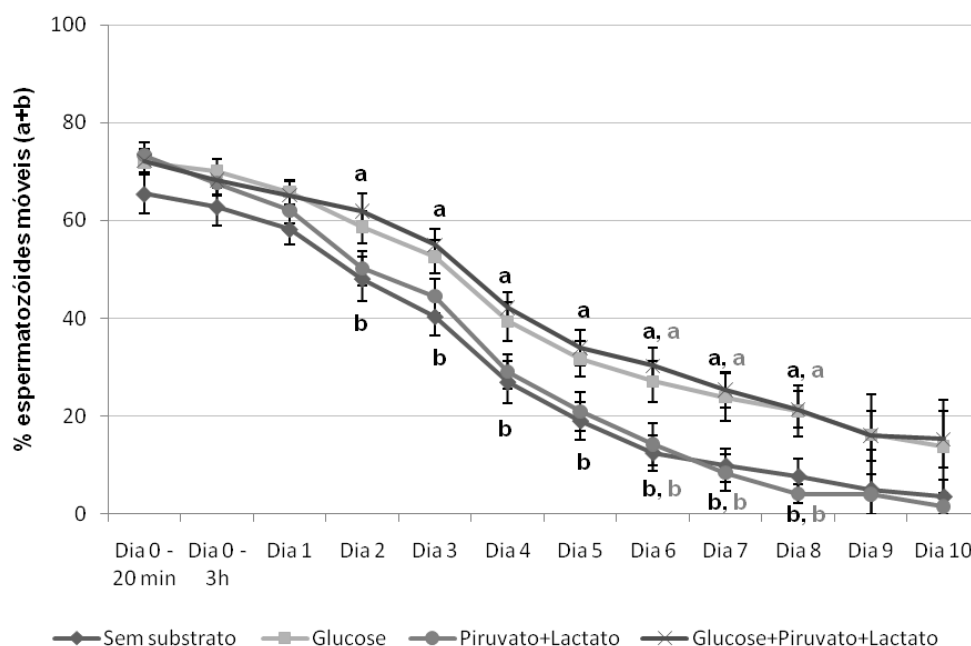


**Figura 3.2** - Comparação entre a percentagem de espermatozóides vivos com mitocôndria funcional em quatro meios de cultura com diferentes substratos, ao longo do tempo. Os resultados representam o valor da média  $\pm$  erro-padrão em percentagem de espermatozóides ( $n$  – consultar tabela 3.1). *a* e *b* representam diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ).

### 3.2.2 Mobilidade progressiva

Em paralelo avaliou-se a percentagem de espermatozóides com mobilidade progressiva nos quatro meios ao longo do tempo; e, à semelhança do anterior, este parâmetro apresentou valores mais elevados nos meios com glucose (Fig 3.3). Registaram-se diferenças estatisticamente significativas entre o meio com os três substratos e o meio sem substratos a partir do dia 2. A partir do dia 6, observaram-se diferenças significativas na comparação entre os meios com e sem glucose. No final do dia 10 as amostras apresentaram, em % média, uma mobilidade progressiva de:  $15,3 \pm 5,9$  (meio com os três substratos);  $13,8 \pm 9,5$  (meio com glucose);  $1,5 \pm 1,5$  (meio com piruvato e lactato); e  $3,5 \pm 3,5$  (meio sem substratos).

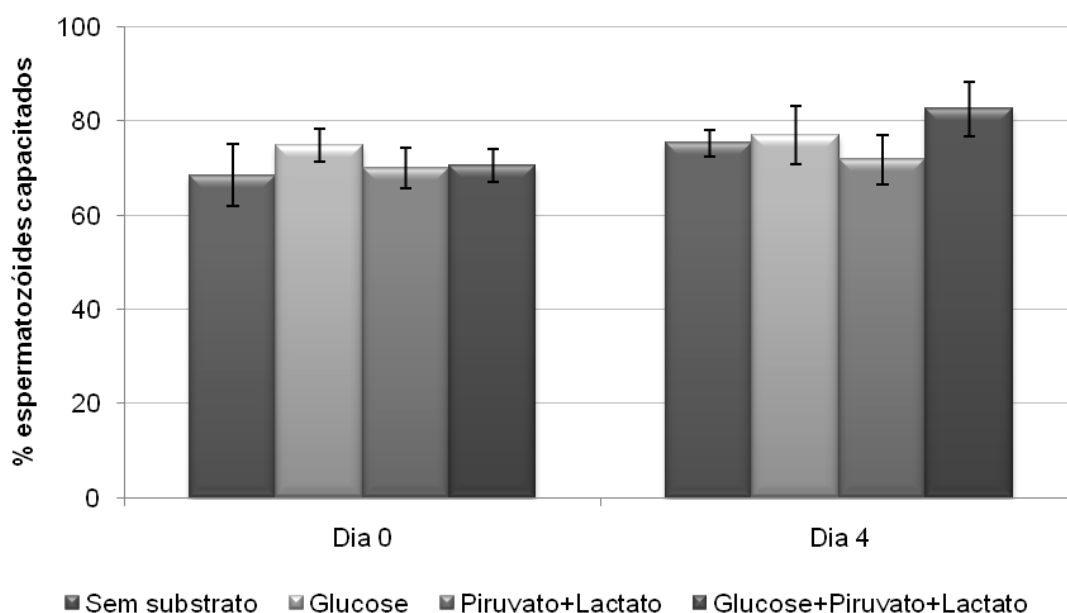
A ausência de diferenças estatisticamente significativas nos dias 9 e 10 é possivelmente explicada pelo baixo número de amostras analisadas nestes dias (Tabela I).



**Figura 3.3** – Comparação entre a percentagem de espermatozóides com mobilidade progressiva (% a+b) em quatro meios de cultura com diferentes substratos, ao longo do tempo. Os resultados representam o valor da média  $\pm$  erro-padrão em percentagem de espermatozóides (n – consultar tabela 3.1). *a* e *b* representam diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ).

### 3.2.3 Capacitação

Para tentar perceber o efeito dos diferentes meios no estado de capacitação de espermatozóides humanos, foram avaliadas 6 amostras, através da detecção de proteínas fosforiladas em resíduos de tirosina por imunocitoquímica, no dia 0 (às 3 horas de incubação) e no dia 4, (Fig. 3.4). Embora tenha havido um ligeiro aumento na percentagem de espermatozóides capacitados no meio com os três substratos do dia 0 ( $70,5 \pm 3,5$ ) para o dia 4 ( $82,5 \pm 5,7$ ), não se verificaram quaisquer diferenças estatisticamente significativas, nem entre os meios no dia 0 e dia 4 separadamente, nem entre os dias.

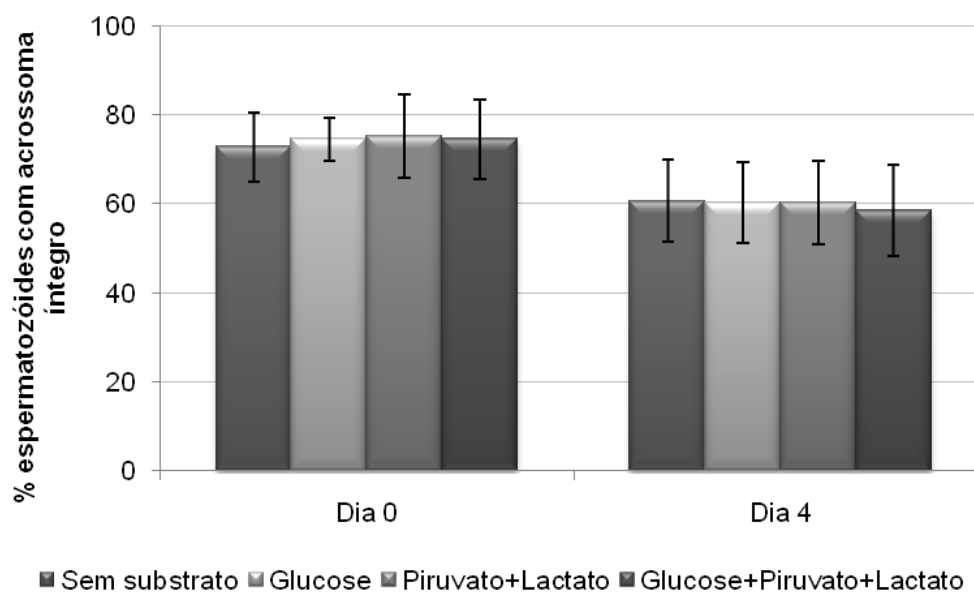


**Figura 3.4** – Percentagem de espermatozóides capacitados, nos quatro meios, nos dias 0 (3 horas) e 4. Os resultados representam o valor da média  $\pm$  erro-padrão em percentagem de espermatozóides ( $n=6$ ).

### 3.2.4 Integridade do acrossoma

Relativamente à integridade do acrossoma também não se verificaram diferenças significativas, embora tenha havido uma redução da percentagem de acrossomas íntegros do dia 0 para o dia 4, uniforme em todos os meios (Fig. 3.5).

Essa redução pode ter-se devido a uma degradação da qualidade espermática ao longo do tempo.



**Figura 3.5** – Percentagem média de espermatozóides com acrossoma íntegro nos quatro meios, nos dias 0 (3 horas) e 4. Os resultados representam o valor da média  $\pm$  erro-padrão em percentagem de espermatozóides (n=6).

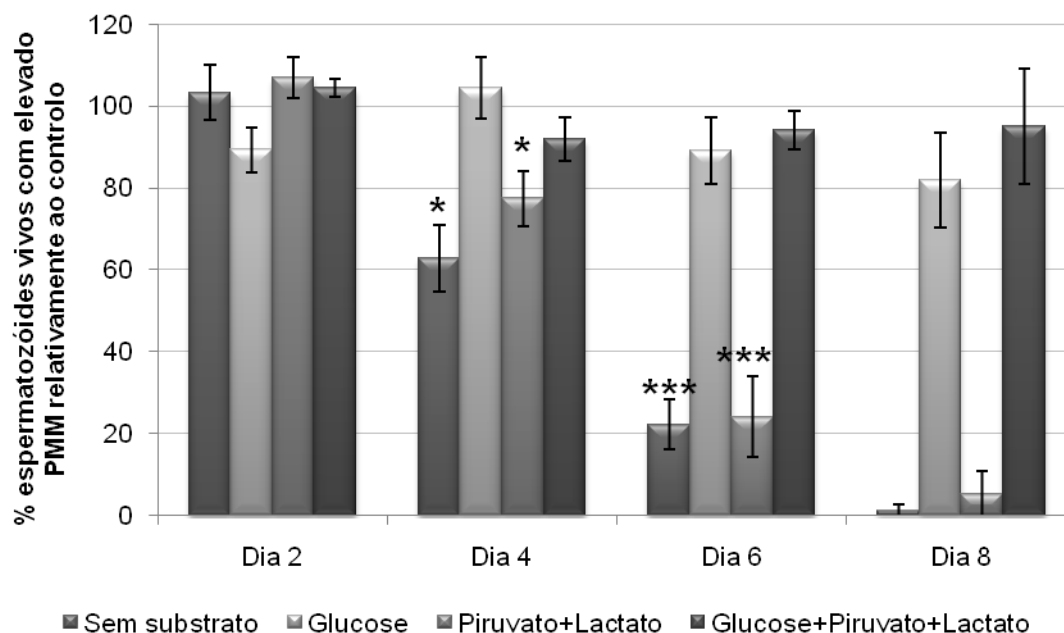
### 3.3 Efeitos de inibidores da glicólise

Para avaliar os efeitos da inibição da glicólise usaram-se dois inibidores glicolíticos: 2-deoxi-D-glucose (DOG; inibidor da hexocinase; n=9) e iodoacetato (IAA; inibidor da gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase; n=9). Todos os resultados apresentados (média  $\pm$  erro-padrão) foram expressos em % de espermatozóides relativamente ao controlo (sem adição do inibidor).

### 3.3.1 2-Deoxi-D-Glucose (DOG)

#### 3.3.1.1 Viabilidade e PMM

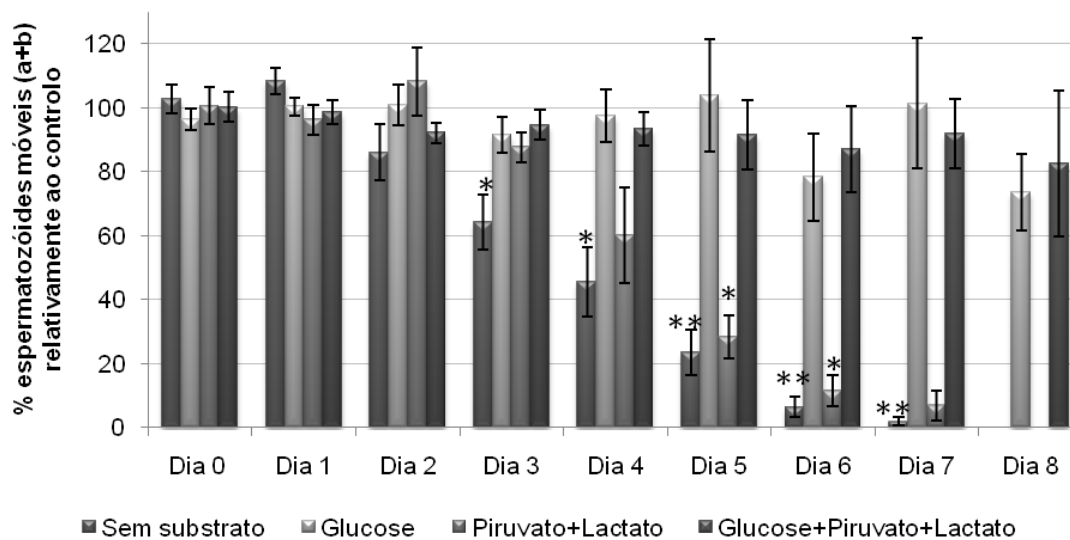
Verificou-se uma diminuição mais acentuada da viabilidade/PMM relativamente ao controlo nos meios sem glucose, sendo esta estatisticamente significativa ao dia 4 e ao dia 6 (Fig 3.6). Nos meios com glucose a presença de DOG parece não ter qualquer efeito na viabilidade relativamente ao controlo, com valores a rondar os 100% ao dia 8 no meio com os três substratos ( $95,1 \pm 14,0\%$ ).



**Figura 3.6** – Percentagem média de espermatozóides viáveis com elevado PMM, na presença de DOG, nos quatro meios, relativamente ao controlo. Os resultados representam o valor da média  $\pm$  erro-padrão em percentagem de espermatozóides ( $n=9$ ). \* $p < 0,05$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .

#### 3.3.1.2 Mobilidade progressiva

Em relação à mobilidade progressiva, a presença de DOG provocou uma redução significativa no meio sem substrato a partir do dia 3 e no meio com piruvato e lactato a partir do dia 5 (Fig. 3.7).

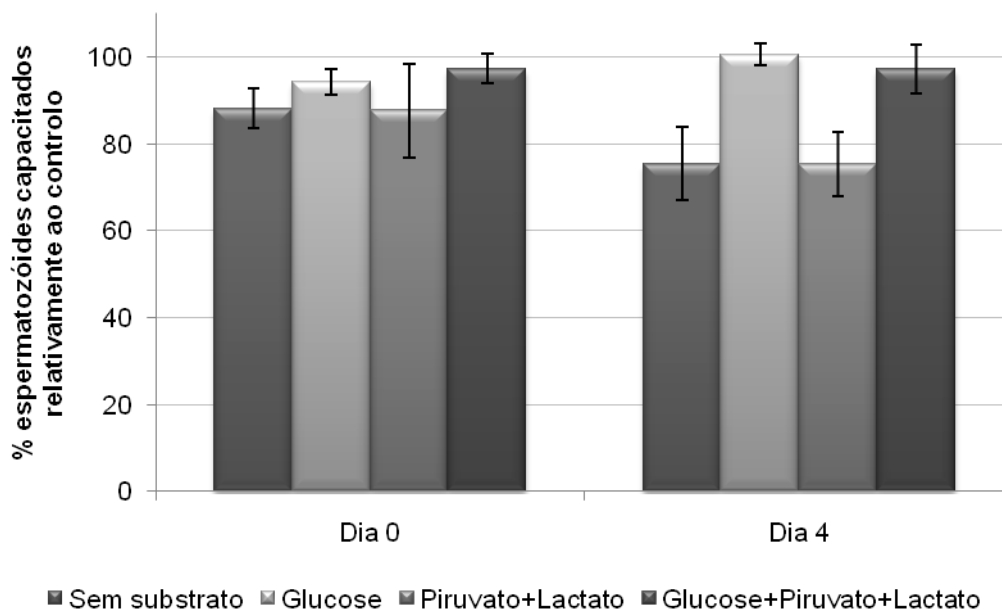


**Figura 3.7** – Percentagem média de espermatozóides móveis (a+b), na presença de DOG nos quatro meios, relativamente ao controlo. Os resultados representam o valor da média  $\pm$  erro-padrão em percentagem de espermatozóides (n=9). \*p < 0,05; \*\*p < 0,01.

### 3.3.1.3 Capacitação

Embora pareça ter havido uma diminuição da percentagem de espermatozóides capacitados relativamente ao controlo nos meios sem glucose do dia 0 para o dia 4, não se verificaram quaisquer diferenças estatisticamente significativas nem na comparação entre os dias, nem em cada dia nos diferentes meios (Fig. 3.8).

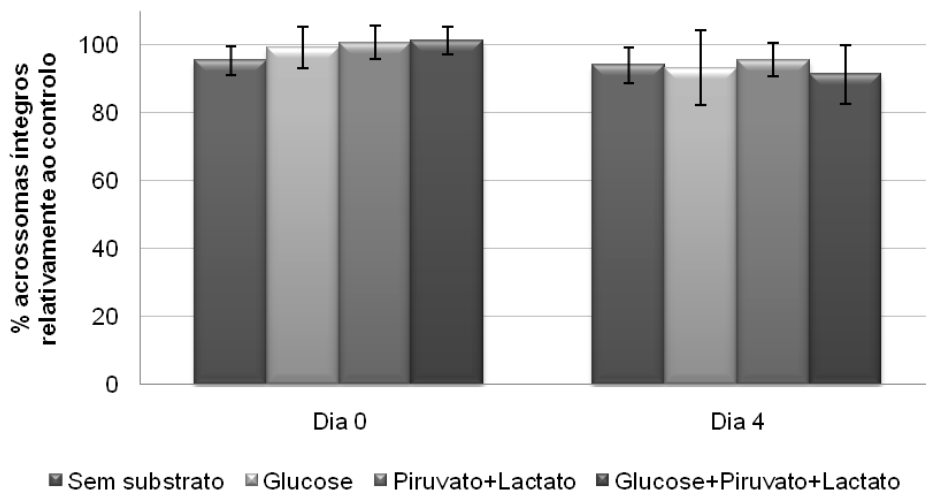




**Figura 3.8** – Percentagem de espermatozóides capacitados na presença de DOG, em relação ao controlo, nos quatro meios, nos dias 0 (3 horas) e 4. Os resultados representam o valor da média  $\pm$  erro-padrão em percentagem de espermatozóides (n=6).

#### 3.3.1.4 Integridade do acrossoma

Relativamente ao efeito da DOG na integridade do acrossoma, não se verificaram diferenças estatisticamente significativas nem na comparação do dia 4 com o dia 0, nem em cada dia nos diferentes meios (Fig. 3.9).

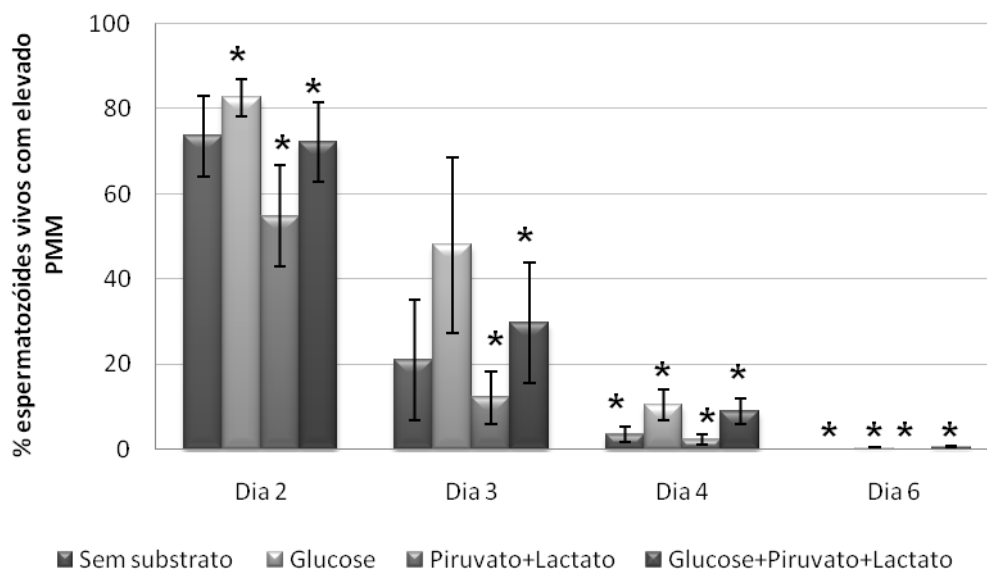


**Figura 3.9** – Percentagem de acrossomas íntegros na presença de DOG, em relação ao controlo, nos quatro meios, nos dias 0 (3 horas) e 4. Os resultados representam o valor da média  $\pm$  erro-padrão em percentagem de espermatozóides em relação ao controlo (n=6).

### 3.3.2 Iodoacetato (IAA)

#### 3.3.2.1 Viabilidade e PMM

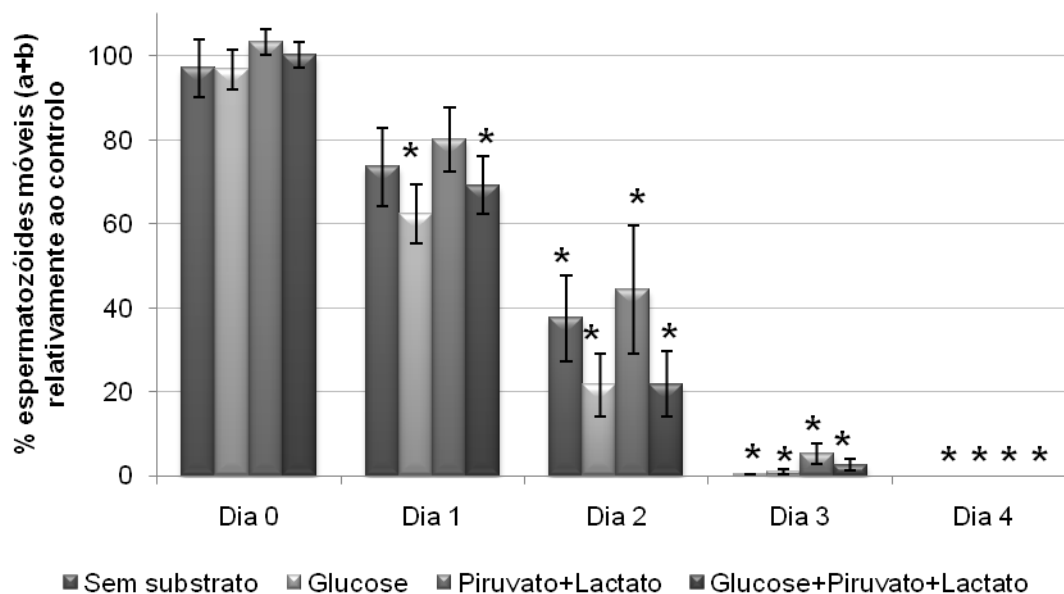
Verificou-se um decréscimo rápido e abrupto na percentagem de espermatozóides viáveis com elevado PMM relativamente ao controlo, ao longo dos dias (Fig. 3.10). No dia 2 registaram-se diferenças significativas em todos os meios com substratos. No dia 3 essas diferenças foram apenas visíveis nos meios com piruvato e lactato. A ausência de diferenças significativas, quer no meio sem substratos, quer no meio com glucose, bem como os elevados valores de erro-padrão associados ao dia 3, podem ter-se devido ao menor número de amostras analisadas neste dia (n=3). Nos dias 4 e 6 registaram-se diferenças significativas em todos os meios, com valores muito baixos de viabilidade/PMM relativamente ao controlo.



**Figura 3.10** – Percentagem média de espermatozóides viáveis com elevado PMM, na presença de IAA, nos quatro meios, relativamente ao controlo. Os resultados representam o valor da média  $\pm$  erro-padrão em percentagem de espermatozóides (n=9). \*p < 0,05.

### 3.3.2.2 Mobilidade progressiva

A avaliação da mobilidade progressiva na presença de IAA mostrou diferenças estatisticamente significativas relativamente ao controlo nos meios com glucose a partir do dia 1, e nos restantes meios a partir do dia 2 (Fig. 3.11). Notou-se também uma descida abrupta na percentagem de espermatozóides com mobilidade progressiva relativamente ao controlo, do dia 0 para ao dia 4, sendo que estes valores se mantiveram mais elevados nos meios sem glucose.



**Figura 3.11** – Percentagem de espermatozóides com mobilidade progressiva (% a+b) relativamente ao controlo, nos quatro meios de cultura na presença de IAA. Os resultados representam o valor da média  $\pm$  erro-padrão em percentagem de espermatozóides (n=9). \*p < 0,05.

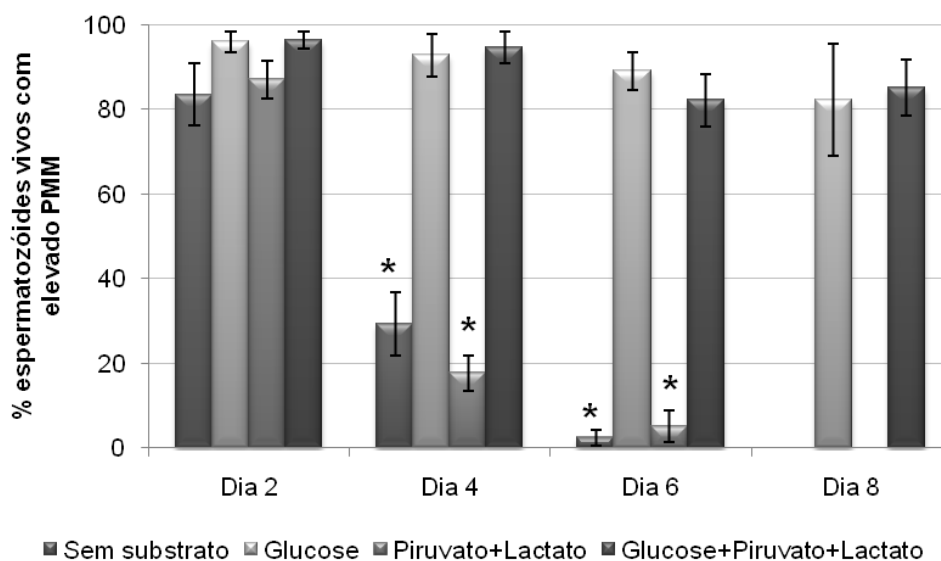
### 3.4 Efeitos do inibidor da fosforilação oxidativa

#### 3.4.1 Cianeto de Potássio (KCN)

Com o objectivo de perceber o papel da fosforilação oxidativa na manutenção dos espermatozóides, foi utilizado cianeto de potássio (KCN), um conhecido inibidor do complexo IV da cadeia respiratória da mitocôndria. Os seus efeitos foram avaliados em 12 amostras e nos quatro meios de cultura. Todos os resultados apresentados (média  $\pm$  erro-padrão) estão em percentagem relativamente ao controlo (sem adição do inibidor).

### 3.4.1.1 Viabilidade e PMM

Na análise da viabilidade/PMM verificou-se uma diminuição significativa da percentagem de espermatozóides viáveis com elevado PMM relativamente ao controlo, nos meios sem glucose, a partir do dia 4 (Fig. 3.12). Nos meios com glucose essa diminuição não ocorreu, parecendo haver uma reversão do efeito da inibição da fosforilação oxidativa pela glucose exógena.

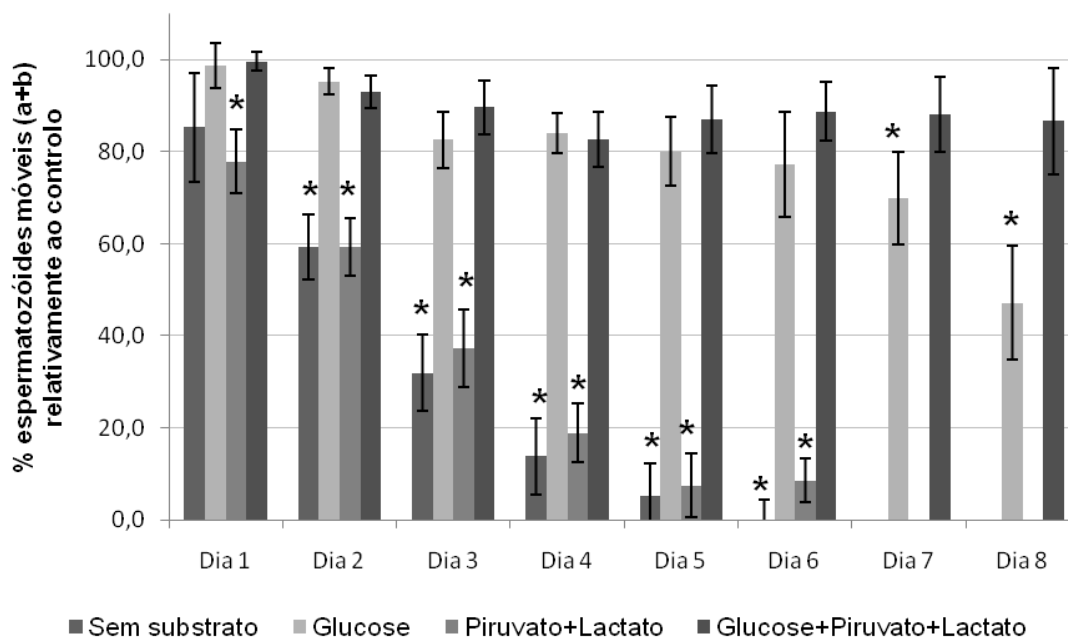


**Figura 3.12** – Percentagem média de espermatozóides viáveis com elevado PMM, na presença de KCN, nos quatro meios, relativamente ao controlo. Os resultados representam o valor da média  $\pm$  erro-padrão em percentagem de espermatozóides (n=12). \*p < 0,05.

### 3.4.1.2 Mobilidade progressiva

Relativamente ao efeito da presença do KCN na mobilidade progressiva, verificou-se uma diminuição mais acentuada da percentagem de espermatozóides móveis (% a+b) relativamente ao controlo nos meios sem glucose (Fig. 3.13). A partir do dia 2, e até ao dia 6, essas diferenças foram significativas para ambos os meios sem glucose. No meio com glucose apenas no dia 7 e 8 se observou uma redução significativa da mobilidade em relação ao controlo. Notou-se ainda que a presença de

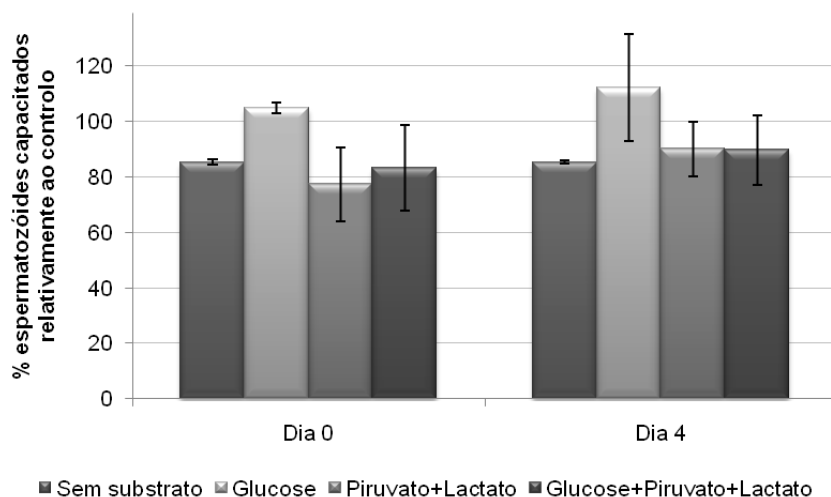
KCN não teve qualquer efeito significativo na mobilidade dos espermatozóides na presença dos três substratos.



**Figura 3.13** – Percentagem de espermatozóides com mobilidade progressiva (% a+b) relativamente ao controlo, nos quatro meios de cultura na presença de KCN. Os resultados representam o valor da média  $\pm$  erro-padrão em percentagem de espermatozóides (n=12). \*p < 0,05.

### 3.4.1.3 Capacitação

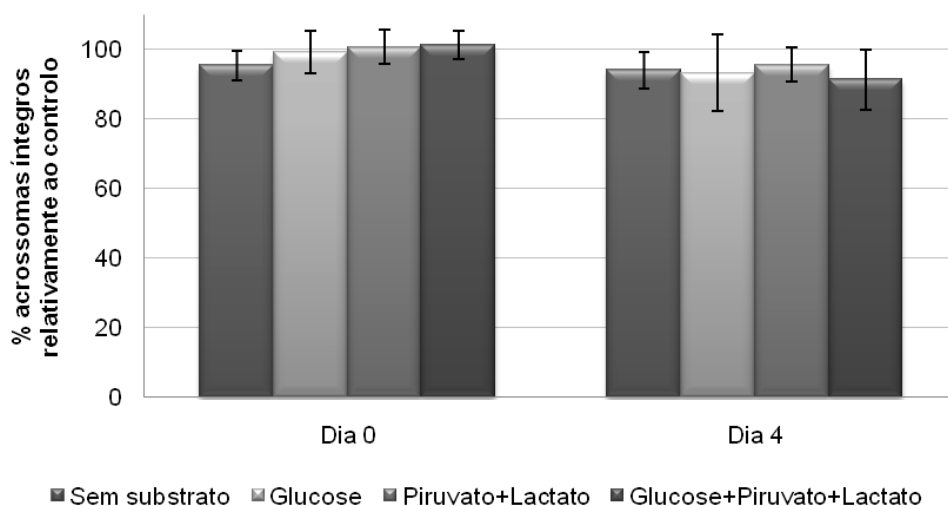
Relativamente ao efeito do KCN na capacitação dos espermatozóides, não se verificaram diferenças estatisticamente significativas na comparação com o controlo (Fig. 3.14).



**Figura 3.14** – Percentagem de espermatozóides capacitados na presença de KCN, em relação ao controlo, nos quatro meios, nos dias 0 (3 horas) e 4. Os resultados representam o valor da média  $\pm$  erro-padrão em percentagem de espermatozóides (n=3).

#### 3.4.1.4 Integridade do acrossoma

Não foram observadas quaisquer diferenças na percentagem de acrossomas íntegros relativamente ao controlo (3.15).

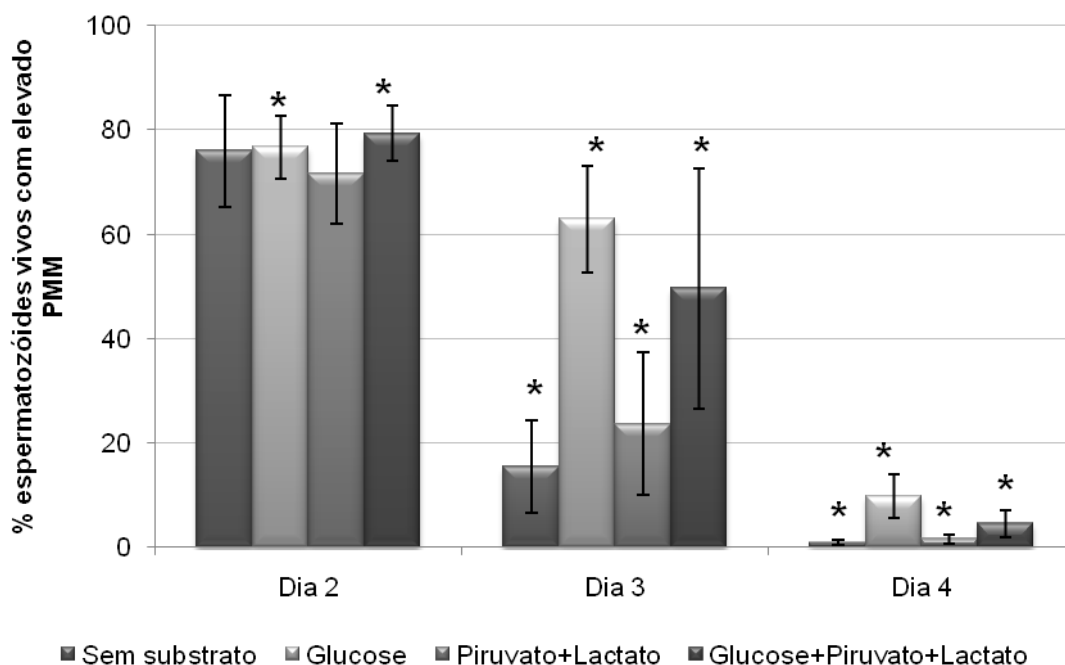


**Figura 3.15** – Percentagem de espermatozóides com acrossoma íntegro na presença de KCN, em relação ao controlo, nos quatro meios, nos dias 0 (3 horas) e 4. Os resultados representam o valor da média  $\pm$  erro-padrão em percentagem de espermatozóides (n=3).

### 3.5 Efeito combinado da inibição das duas vias

#### 3.5.1 Viabilidade e PMM

Na combinação de dois inibidores (IAA e KCN) em 6 amostras, notou-se uma diminuição abrupta da percentagem de espermatozóides viáveis/PMM relativamente ao controlo (no dia 2 a viabilidade rondava os 80% e no dia 4 estava perto de 0%; Fig. 3.16). Observaram-se diferenças estatísticas no dia 2 nos meios com glucose, e a partir do dia 3 em todos os meios.



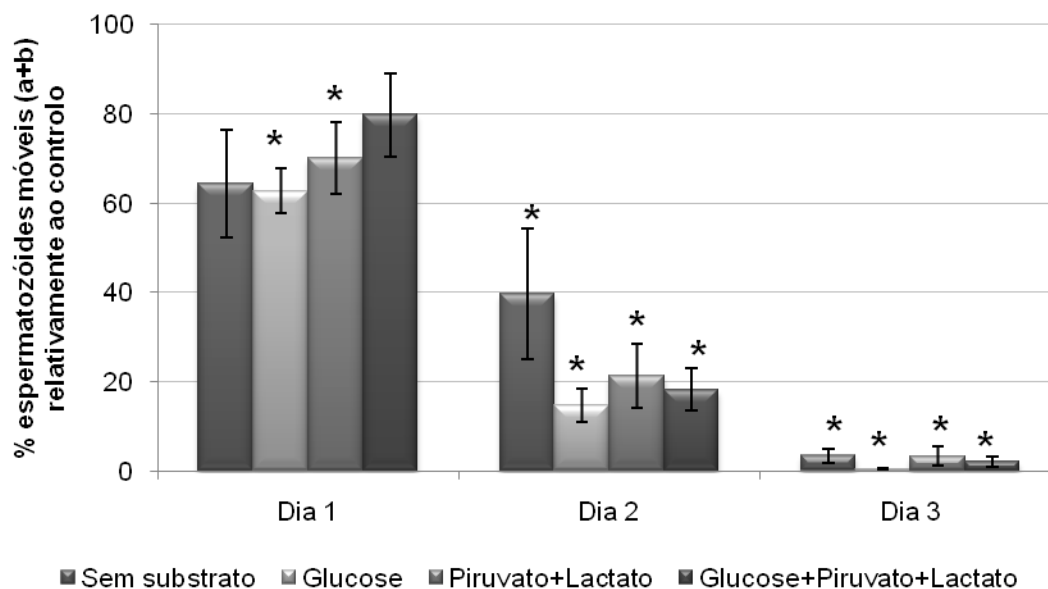
**Figura 3.16** – Percentagem média de espermatozóides viáveis com elevado PMM, relativamente ao controlo, nos quatro meios, na presença de IAA e KCN. Os resultados representam o valor da média  $\pm$  erro-padrão em percentagem de espermatozóides (n=6). \*p < 0,05.

#### 3.5.2 Mobilidade progressiva

Relativamente à mobilidade progressiva na presença dos dois inibidores, foi notória uma diminuição logo no dia 1 (Fig. 3.17). O meio com os três



substratos foi aquele que apresentou maior percentagem de espermatozóides móveis em relação ao controlo. No dia 2 todos os meios apresentaram diferenças com significância estatística. No dia 3 os espermatozóides estavam praticamente imóveis.



**Figura 3.17** – Percentagem de espermatozóides com mobilidade progressiva (% a+b) relativamente ao controlo, nos quatro meios de cultura na presença de IAA e KCN. Os resultados representam o valor da média  $\pm$  erro-padrão em percentagem de espermatozóides (n=6). \*p < 0,05.

## **Capítulo 4 – Discussão**

#### **4. Discussão**

Os resultados obtidos neste trabalho indicaram que é possível a manutenção de espermatozóides humanos viáveis em cultura, durante vários dias, possibilitando assim a criação de um modelo mais fisiológico para o estudo dos gâmetas masculinos, tendo em consideração o tempo que estes podem permanecer no tracto reprodutor feminino (3-5 dias; Gould *et al.*, 1984). A monitorização de espermatozóides em co-cultura com células do oviducto humano seria também uma abordagem interessante, uma vez que estas parecem ter um efeito positivo na sobrevivência de espermatozóides *in vitro* (Ellington *et al.*, 1998). No entanto, este ensaio, para além de mais trabalhoso, estaria dependente da obtenção de material biológico humano feminino, o que seria limitativo. A utilização de um meio de cultura com glucose, piruvato e lactato, em concentrações semelhantes às encontradas no tracto reprodutor feminino, apresenta-se como um ensaio fácil que permite manter espermatozóides durante vários dias e controlar melhor as condições experimentais. Este tipo de abordagem pode fornecer informação valiosa para a compreensão da biologia do gâmeta masculino, permitindo, entre outras coisas uma avaliação da degradação da qualidade espermática ao longo do tempo.

##### **4.1 Efeito da temperatura na manutenção da viabilidade espermática**

Os primeiros resultados, relativos à incubação de espermatozóides a diferentes temperaturas indicaram que a viabilidade dos espermatozóides depende da temperatura de incubação. Embora a maioria dos estudos com espermatozóides utilize incubações curtas a 37 °C, este trabalho mostrou que, das três temperaturas testadas, esta é a pior para a manutenção de gâmetas masculinos viáveis durante vários dias, provocando um decréscimo significativo na viabilidade. Estes valores podem ter-se devido a um aumento da destabilização membranar, com aumento da fluidez das

membranas, resultando num decréscimo da integridade. Os resultados obtidos a 4 °C poderão estar relacionados com uma redução das taxas metabólicas, acompanhado de um decréscimo da fluidez membranar, diminuindo a percentagem de células com membrana celular comprometida. Estes resultados ajudaram a estabelecer a temperatura ambiente como a que melhor se adequa à manutenção de espermatozóides humanos em cultura durante dias. Estes resultados estão de acordo com outro estudo efectuado apenas a 4 °C e temperatura ambiente, embora com objectivos diferentes (Cohen *et al.*, 1985).

#### **4.2 Cultura de espermatozóides e metabolismo**

Neste estudo foi utilizado o sistema de culturas em meio líquido para estudar o metabolismo dos espermatozóides numa escala temporal mais alargada do que a geralmente usada em estudos do mesmo género. Está relativamente bem estabelecido que as duas principais fontes de ATP no espermatozóide são a fosforilação oxidativa e a glicólise, mas o balanço entre estas duas vias é ainda alvo de debate (ver introdução).

Os resultados deste trabalho mostraram que os espermatozóides conseguem sobreviver durante vários dias sem qualquer substrato exógeno, com algumas das células apresentando mitocôndias funcionais e mobilidade progressiva, mais de uma semana após ejaculação. Em concordância com estes resultados, alguns estudos mostram que a respiração endógena pode suportar a mobilidade dos espermatozóides por algumas horas (Sutre *et al.*, 1979; Ford e Harrison, 1981b). Este facto parece indicar a utilização de substratos endógenos para a manutenção da mobilidade, embora se desconheça a natureza desses substratos.

Aparentemente o tempo que uma amostra pode ser mantida *in vitro* com mobilidade progressiva, depende não só da sua qualidade inicial, como também do(s)

substrato(s) presente(s) no meio de cultura. Verificámos neste estudo que a presença de substratos exógenos, nomeadamente glucose, parece ser favorável à manutenção de espermatozóides com viabilidade, funcionalidade mitocondrial (elevado PMM) e mobilidade progressiva durante maior número de vários dias.

Relativamente à capacitação dos espermatozóides, detectada pela fosforilação de resíduos de tirosina, não se verificaram quaisquer diferenças significativas entre a percentagem de espermatozóides capacitados no dia 0 e no dia 4, mantendo valores elevados, apesar de este ser um processo reversível. Estes resultados parecem indicar que a capacitação é um processo independente do tipo de substrato metabólico presente no meio (exógeno), embora alguns autores defendam que a glucose é necessária para que haja capacitação e reacção acrossómica em espermatozóides humanos (Hoshi *et al.*, 1991; Williams e Ford, 2001). No que diz respeito à preponderância dos diferentes substratos na reacção acrossómica, seriam necessários ensaios funcionais de indução da reacção acrossómica (Oehninger e Franken, 2006) para a sua avaliação. A ligeira redução de acrossomas íntegros, embora não seja significativa, pode dever-se ao facto de haver uma degradação da qualidade espermática ao longo do tempo.

#### **4.3 Efeitos da adição de inibidores metabólicos**

Grande parte dos estudos metabólicos tem por base o desenho experimental simples da incubação dos espermatozóides em curtos períodos de tempo (geralmente 1-3 horas, não ultrapassando as 24 horas), em meios em que se fazem variar tanto o substrato metabólico presente, como a quantidade do mesmo, avaliando alguns parâmetros como a mobilidade, na presença e ausência de inibidores metabólicos ou desacopladores da cadeia respiratória da mitocôndria (Sutre *et al.*, 1979; Ford e Harrison, 1981a; Hyne e Edwards, 1985; Ford and Harrison, 1986; Bone *et al.*, 2001;

Nascimento *et al.*, 2008). Embora estes trabalhos tenham um importante papel na compreensão do metabolismo dos espermatozóides, há alguns aspectos que devem ser considerados na comparação de resultados, nomeadamente o facto de por vezes não serem efectuados nem na mesma espécie nem nas mesmas condições experimentais: temperatura, substratos metabólicos constituintes dos meios, inibidores e concentrações dos mesmos (Ramalho-Santos *et al.*, 2009).

Nesta parte do trabalho, tentou avaliar-se o efeito da inibição da glicólise e/ou da fosforilação oxidativa nos vários parâmetros em espermatozóides humanos, com destaque para a mobilidade e funcionalidade da mitocôndria, na presença ou ausência dos diferentes substratos.

A adição de 2-deoxi-D-glucose (DOG), escolhida por bloquear a glicólise numa fase inicial, não inibiu a mobilidade como esperado e descrito noutros trabalhos nas mesmas condições experimentais (Mukai e Okuno, 2004). Este é um inibidor competitivo, descrito como inibidor da mobilidade dos espermatozóides na presença de glucose (Hyne e Edwards, 1985; Williams e Ford; 2001; Mukai e Okuno, 2004). Os resultados deste trabalho mostraram que, precisamente nos meios com glucose, essa diminuição nunca foi significativa em relação ao controlo. O mesmo se verificou com a viabilidade e potencial de membrana mitocondrial a partir do dia 4, não ocorrendo, mais uma vez qualquer diferença significativa em relação ao controlo, na presença de glucose. A redução significativa destes parâmetros nos meios sem glucose poderia indicar uma competição da DOG com substratos endógenos e consequente inibição da glicólise. No entanto estes resultados estão em discórdia com a literatura, em que, com incubações de poucas horas (1-3 horas), se observam efeitos visíveis de inibição arguindo que por esse motivo a glicólise tem um papel preponderante na mobilidade dos espermatozóides (Williams e Ford; 2001; Mukai e Okuno, 2004). O facto de não haver qualquer efeito da DOG na percentagem de capacitação e reacção acrossómica, não é provavelmente significativo, uma vez que tudo parece indicar uma

ausência de efeito desde inibidor nas condições experimentais usadas, e contrariamente ao previsto após análise da literatura.

Por esse motivo foi utilizado outro inibidor da glicólise, o iodoacetato (IAA) que, como esperado (Witters e Foley, 1976), resultou numa diminuição abrupta da mobilidade dos espermatozóides, primeiro nos meios com glucose, e depois em todos os meios, indicando que a glicólise pode de facto ser essencial para manter essa funcionalidade dos espermatozóides, como defendido por vários autores (Bone *et al.*, 2001; Williams e Ford; 2001; Mukai e Okuno, 2004;). No entanto, o efeito do IAA nestas células não é claro. Sabe-se que o IAA interfere com resíduos de cisteína das proteínas reagindo com grupos sulfidrilo (-SH-) das mesmas. Esta propriedade resulta na inibição de enzimas glicolíticas, como é o caso da gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase-S (GAPDH-S), mas poderá também danificar grupos -SH- noutras enzimas e proteínas estruturais ricas em resíduos de cisteína, abundantes no espermatozóide, sugerindo que talvez seja esse o mecanismo que torna o IAA um agente espermicida (Jones e Mann, 1977). Assim, e embora a concentração de IAA utilizada neste trabalho tenha sido baixa, aquando da interpretação dos resultados obtidos, importa ter em conta a possibilidade de este inibidor ter tido outros efeitos para além da inibição da glicólise. A utilização frequente de inibidores da GAPDH-S (Hyne e Edwards, 1985; Ford e Harrison, 1986; Bone *et al.*, 2001; Williams e Ford, 2001; Mukai e Okuno, 2004) ou a criação de modelos de ratinho KO para esta enzima (Miki *et al.*, 2004) ou para a fosfoglicerato cinase 2 (PGK2; Danisha *et al.*, 2010) tem sido utilizada por vários autores para justificar uma maior preponderância da glicólise, uma vez que os resultados revelaram um decréscimo na mobilidade dos espermatozóides relativamente ao controlo. No entanto, para interpretar estes resultados deve ter-se em consideração o facto de estas experiências resultarem num bloqueio da via glicolítica após a fase de consumo de ATP (Ford, 2006; Ruiz-Pesini *et al.*, 2007; Storey, 2008). Ou seja, nestas condições experimentais, apesar de se

bloquear a produção de ATP *via glicólise*, é inevitavelmente consumido ATP por esta via (que provém, muito provavelmente, do processo de fosforilação oxidativa).

O decréscimo da mobilidade em espermatozóides incubados com cianeto de potássio (KCN) na ausência de substratos parece indicar que a fosforilação oxidativa poderá estar envolvida no metabolismo endógeno. A utilização de ácidos gordos, tal como descrito em espermatozóides de suíno (Jones e Bubb, 2000), pode ser uma hipótese, mas estudos adicionais serão necessários para testar esta hipótese em espermatozóides humanos. No entanto, os resultados do efeito do KCN na mobilidade dos espermatozóides parecem ser completamente revertidos pela presença de glucose no meio, o que está de acordo com os resultados de outros autores que defendem que a via glicolítica é suficiente para produção de quantidades de ATP para sustentar a mobilidade (Peterson and Freund, 1970; Suter et al, 1979; Ford and Harrison, 1981b; Nascimento et al, 2008). A presença de KCN não revelou efeitos significativos na percentagem de espermatozóides capacitados e com acrossomas íntegros. Este facto poderá indicar uma menor relevância da fosforilação oxidativa tanto no processo de fosforilação de tirosinas, como na manutenção da integridade do acrossoma, não descartando um papel da mitocôndria na sinalização celular ao longo destes processos (Hoshi *et al*, 1991; Williams e Ford, 2001).

A junção dos dois inibidores, da via glicolítica (IAA) e da fosforilação oxidativa (KCN), revelou efeitos mais abruptos na diminuição da viabilidade/PMM de espermatozóides do que a incubação apenas com KCN. Curiosamente, pareceu haver menos efeito na junção dos dois inibidores do que na adição de IAA. Estes resultados, talvez se devam ao facto de o KCN diminuir a actividade mitocondrial, diminuindo assim a produção de espécies reactivas de oxigénio (ROS), que possam aumentar a peroxidação lipídica, cujos produtos podem ter efeitos semelhantes ao IAA, potenciando a toxicidade do mesmo (Jones e Mann, 1977). Na mobilidade progressiva



relativamente ao controlo, a junção dos dois inibidores parece indicar um efeito cumulativo, que possivelmente se deveu em grande parte à presença de IAA.

Embora haja muitos trabalhos que defendem uma maior preponderância de uma das vias, glicólise ou fosforilação oxidativa (ver introdução), o facto de estas vias metabólicas estarem interligadas não deve ser ignorado, uma vez que os produtos de uma via podem ser substratos da outra (Nelson e Cox, 2004), o que torna difícil a inibição da primeira sem inibir a segunda. A glicólise é frequentemente um pré-requisito para a fosforilação oxidativa, mas precisa de energia numa fase inicial (Conley *et al.*, 2001). Ainda assim, pode haver pelo menos duas razões para justificar uma baixa actividade da fosforilação oxidativa no espermatozóide: os baixos níveis de oxigénio existentes no tracto reprodutor feminino (Fisher e Bavister, 1993) e a tentativa de controlar a quantidade de ROS produzida para manter a integridade do genoma nuclear e mitocondrial (Brookes *et al.*, 2004; Makker *et al.*, 2009).

Na verdade, cada vez mais se acredita que ambas as vias são necessárias para sustentar os diferentes aspectos celulares de que depende a funcionalidade de um espermatozóide (Ramalho-Santos *et al.*, 2009) e que estas funcionam de uma forma integrada para rentabilizar a produção de ATP. Os resultados deste trabalho parecem indicar que a presença de glicose favorece a manutenção da viabilidade/PMM e mobilidade progressiva dos espermatozóides humanos. A adição de substratos exógenos pode resultar numa redução da oxidação de substratos endógenos (Murdoch e White, 1968). No entanto são necessários mais estudos de metabolismo com outro tipo de condições (diferentes concentrações de substratos, inibidores) utilizando este sistema de culturas a longo termo, em paralelo com a identificação de substratos endógenos, para determinar qual será o verdadeiro perfil energético dos espermatozóides humanos.

## **Capítulo 5 – Conclusões**

## 5. Conclusões

Este trabalho permitiu estabelecer a cultura de espermatozóides humanos em meio líquido como um novo modelo de estudo dos gâmetas masculinos a longo prazo, tentando mimetizar o que acontece no tracto reprodutor feminino. Os resultados indicaram que é possível a manutenção de uma amostra de espermatozóides humanos viáveis e móveis durante vários dias *in vitro*, à semelhança do que acontece no oviducto humano. O tempo de manutenção de espermatozóides humanos *in vitro* mostrou ser dependente da temperatura de incubação, concluindo-se que a incubação à temperatura ambiente parece ser mais adequada do que a temperatura de 37 °C, utilizada na maioria dos estudos com gâmetas masculinos.

Os resultados obtidos parecem ainda mostrar que o metabolismo endógeno é suficiente para manter a viabilidade e mobilidade progressiva dos espermatozóides humanos durante alguns dias. No entanto, a presença de glucose parece ser favorável à manutenção da viabilidade, funcionalidade mitocondrial e mobilidade progressiva.

Adicionalmente, a incubação com os inibidores glicolíticos 2-deoxi-D-glucose e iodoacetato não parece ser a melhor opção para a inibição da glicólise em espermatozóides humanos, contrariamente ao que está descrito na literatura, uma vez que o primeiro pareceu não inibir a glicólise e o segundo poderá ter tido outros efeitos ao nível da toxicidade celular. Por outro lado, a utilização de cianeto de potássio como inibidor da fosforilação oxidativa, pareceu ter um efeito no metabolismo endógeno, reduzindo a mobilidade progressiva. Ainda assim, os resultados sugerem que este efeito pode ser revertido pela presença de glucose.

Conclui-se assim que o balanço energético entre as duas vias metabólicas, glicólise e fosforilação oxidativa, continua indefinido. Por isso seria interessante futuramente utilizar o sistema de culturas de espermatozóides humanos em meio líquido como nova abordagem em estudos de metabolismo, avaliando não só o

balanço destas duas vias como a preponderância da utilização de outros substratos metabólicos, como por exemplo os lípidos. Esta nova abordagem de estudo da função de espermatozóides humanos poderá ser utilizada em diversas áreas, como a toxicologia e a bioenergética, contribuindo para uma melhor compreensão da biologia do espermatozóide.

## **Capítulo 6 – Bibliografia**

## 6. Bibliografia

- Abou-haila A and Tulsiani DRP. (2009) Signal transduction pathways that regulate sperm capacitation and acrosome reaction. *Archives of Biochemistry and biophysics*. **485**: 72-81.
- Aitken R.J. and Bennetts L.. (2006) Reactive oxygen species: friends or foe *in* The Sperm Cell: Production, Maturation, Fertilization, Regeneration. 1ª edição. Cambridge University Press, UK. pp. 170-193.
- Amaral A and Ramalho-Santos J. (2010) Assessment of mitochondrial potential: implications for the correct monitoring of human sperm function. *International Journal of Andrology*. **33**: e180-e186.
- Amaral A, Ramalho-Santos J and St John JC. (2007) The expression of polymerase gamma and mitochondrial transcription factor A and the regulation of mitochondrial DNA content in mature human sperm. *Human Reproduction*. **22**: 1585-1596.
- Andersen AN, Goossens V, Ferraretti AP, Bhattacharya S, Felberbaum R, de Mouzon J and Nygren KG. (2008) Assisted reproductive technology in Europe, 2004: results generated from European registers by ESHRE. *Human Reproduction*. **23**: 756-771.
- Balhorn R. (1982) A model for the structure of chromatin in mammalian sperm. *Journal of Cell Biology*. **93**: 293-305.
- Bone W, Jones AR, Morin C, Nieschlag E, and Cooper TG. (2001) Susceptibility of glycolytic enzyme activity and motility of spermatozoa from rat, mouse, and human to inhibition by proven and putative chlorinated antifertility compounds in vitro. *Journal of Andrology*. **22**: 464-470.

- Brewer L, Corzett M and Balhorn R (2002) Condensation of DNA by spermatid basic nuclear proteins. *Journal of Biological Chemistry*. **277**: 38895–38900.
- Brookes P.S., Yoon Y., Robotham J.L., Anders M.W. and Sheu S. (2004) Calcium, ATP, and ROS: a mitochondrial love-hate triangle. *American Journal Physiology – Cell Physiology*. **287**: 817-833.
- Brookes PS. (2005) Mitochondrial H<sup>+</sup> leak and ROS generation: An odd couple. *Free Radical Biology & Medicine*. **38**: 12-23.
- Cohen J, Fehilly CB, Walters DE. (1985) Prolonged storage of human spermatozoa at room temperature or in refrigerator. *Fertility and Sterility*. **44**: 254-262.
- Conley K.E., Kemper W.F. and Crowther G.J. (2001) Limits to sustainable muscle performance: interaction between glycolysis and oxidative phosphorylation. *The Journal of Experimental Biology*. **204**: 3189-3194.
- Cooper T.G. and Yeung C. (2006) Sperm maturation in the human epididymis *in* The Sperm Cell: Production, Maturation, Fertilization, Regeneration. 1ª edição. Cambridge University Press, UK. pp. 72-106.
- Cooper TG (2007) Sperm maturation in the epididymis: a new look at an old problem. *Asian Journal of Andrology*. **9**: 533-539.
- Danshina P.V., Geyer C.B., Dai Q., Goulding E.H., Willis W.D., Kitto G.B., McCarrey J.R., Eddy E.M. and O'Brien D.A. (2010) Phosphoglycerate Kinase 2 (PGK2) Is Essential for Sperm Function and Male Fertility in Mice. *Biology of Reproduction*. **82**: 136-145.
- de Kretser DM, Loveland KL, Meinhardt A, Simorangkir D and Wreford N. (1998) Spermatogenesis. *Human Reproduction*. **13**: 1-8.

- de Lamirande E and Gagnon C. (1992) Reactive Oxygen Species and Human Spermatozoa – I. Effects on the motility of intact spermatozoa and on sperm axonemes. *Journal of Andrology*. **13**: 368-378.
- de Lamirande E and Lamothe G. (2010) Levels of semenogelin in human spermatozoa decrease during capacitation: involvement of reactive oxygen species and zinc. *Human Reproduction*. **25**: 1619-1630.
- de Lamirande E and O'Flaherty C. (2008) Sperm activation: Role of reactive oxygen species and kinases. *Biophysica Acta (BBA) – Proteins & Proteomics*. **1784**: 106-115.
- de Lamirande E, Jiang H, Zini A, Kodama H and Gagnon C. (1997a) Reactive oxygen species and sperm physiology. *Reviews of Reproduction*. **2**: 48-54.
- de Lamirande E., Leclerc P. and Gagnon C. (1997b) Capacitation as a regulatory event that primes spermatozoa for the acrossome reaction and fertilization. *Molecular Human Reproduction*. **3**: 175-194
- de Martino C, Floridi A, Marcante ML, Malorni W, Scorza-Barcellona P, Bellocci M, and Silvestrini B. (1979) Morphological, histochemical and biochemical studies on germ cell mitochondria of normal rats. *Cell Tissue Research*. **196**: 1-22.
- Ellington J.E., Jones A.E., Davitt C.M., Schneider C.S., Brisbois R.S., Hiss G.A. and Wright Jr R.W. (1998) Human sperm function in co-culture with human, macaque or bovine oviduct epithelial cell monolayers. *Human Reproduction*. **13**: 2797-2804.
- Fernández-Silva P, Enriquez JA and Montoya J. (2003) Special Review Series – Biogenesis and Physiological Adaptation of Mitochondria: Replication and



- transcription of mammalian mitochondrial DNA. *Experimental Physiology*. **88**: 41–56.
- Fischer B. and Bavister B.D. (1993) Oxygen tension in the oviduct and uterus of rhesus monkeys, hamsters and rabbits. *Journal of Reproduction and Fertility*. **99**: 673-679.
- Florman HM, Jungnickel MK and Sutton KA (2008) Regulating the acrossome reaction. *International Journal of Developmental Biology*. **52**: 503-510.
- Ford WC and Harrison A. (1981a) The effect of 6-chloro-6-deoxysugars on adenine nucleotide concentrations in and motility of rat spermatozoa. *Journal of Reproduction & Fertility*. **63**: 75-79.
- Ford WC and Harrison A. (1981b) The role of oxidative phosphorylation in the generation of ATP in human spermatozoa. *Journal of Reproduction & Fertility*. **63**: 75-79.
- Ford WC and Harrison A. (1985) The presence of glucose increases the lethal effect of  $\alpha$ -chlorohydrin on ram and boar spermatozoa *in vitro*. *Journal of Reproduction & Fertility*. **73**: 197-206.
- Ford WC and Harrison A. (1986) The concentrated effect of  $\alpha$ -chlorohydrin and glucose on the ATP concentration in spermatozoa is associated with the accumulation of glycolytic intermediates. *Journal of Reproduction & Fertility*. **77**: 537-545.
- Ford WC and Waites GMH. (1978) A reversible contraceptive action of some 6-chloro-6-deoxy sugars in the male rat. *Journal of Reproduction & Fertility*. **52**: 153-157.
- Ford WC. (2006) Glycolysis and sperm motility: does a spoonful of sugar help the flagellum go round? *Human Reproduction Update*. **12**: 269-274.

- Fox SI. (1999) *Human Physiology*, 6ª Edição. McGraw-Hill, Boston. Pp: 641-687.
- Gadella BM and Visconti PE. (2006) Regulation of capacitation *in The Sperm Cell: Production, Maturation, Fertilization, Regeneration*. 1ª edição. Cambridge University Press, UK. pp. 134-169.
- Gadella BM, Tsai P, Boerke A and Brewis IA (2008) Sperm head membrane reorganization during capacitation. *International Journal of Developmental Biology*. **52**: 473-480.
- Gagnon C and de Lamirande E (2006) Controls of sperm motility *in The Sperm Cell: Production, Maturation, Fertilization, Regeneration*. 1ª edição. Cambridge University Press, UK. pp. 108-133.
- Gallon, F., Marchetti, C., Jouy, N. and Marchetti, P. (2006) The functionality of mitochondria differentiates human spermatozoa with high and low fertilizing capability. *Fertility and Sterility* **86**: 1526-1530.
- Garner DL and Johnson LA. (1995) Viability assessment of mammalian sperm using SYBR-14 and Propidium Iodide. *Biology of Reproduction*. **53**: 276-284.
- Gould JE, Overstreet JW and Hanson FW. (1984) Assessment of Human Sperm Function After Recovery from the Female Reproductive Tract. *Biology of Reproduction*. **31**: 888-894.
- Hinsch E, Ponce AA, Hägele W, Hedrich F, Müller-Schlösser F, Schill W-B and Hinsch K-D. (1997) A new combined in-vitro test model for the identification of substances affecting essential sperm functions. *Human Reproduction*. **12**: 1673-1681.

- Ho HC and Wey S. (2007) Three dimensional rendering of the mitochondrial sheath morphogenesis during mouse spermiogenesis. *Microscopy Research and Technique*. **70**: 719-23.
- Holstein A, Schulze W and Davidoff M. (2003) Understanding spermatogenesis is a prerequisite for treatment. *Reproductive Biology and Endocrinology*. **1**: 107.
- Hong CY, Chiang BN and Wei YH. (1983) Mitochondrial respiration inhibitors and human sperm motility: implications in the development of spermicides. *British Journal of Clinica Pharmacology*. **16**: 487-490.
- Hoshi K, Tsukikawa S and Sato A. (1991) Importance of Ca<sup>2+</sup>, K<sup>+</sup> and Glucose in the Medium for Sperm Penetration through the Human Zona Pellucida. *Tohoku journal of Experimental Medicine*. **165**: 99-104.
- Hyne RV and Edwards KP (1985) Influence of 2-Deoxy-D-glucose and energy substrates on guinea-pig sperm capacitation and acrossome reaction. *Journal of Reproduction and Fertility*. **73**: 59-69.
- Jansen RP and Burton GJ. (2004) Mitochondrial dysfunction in reproduction. *Mitochondrion*. **4**: 577-600.
- Jones R. and Mann T. (1977) Toxicity of exogenous fatty acid peroxides towards spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility*. **50**: 255-260.
- Kang HT and Hwang ES. (2006) 2-Deoxyglucose: An anticancer and antiviral therapeutic, but not any more a low glucose mimetic. *Life Sciences*. **78**: 1392-1399.
- Kierszenbaum AL. (2000) Fusion of Membranes During the Acrossome Reaction: A Tale of Two SNAREs. *Molecular Reproduction and Development*. **57**: 309-310.

- Kim YH, Haidl G, Schaefer M, Egner U, Mandal A and Herr JC. (2007) Compartmentalization of a unique ADP/ATP carrier protein SFEC (Sperm Flagellar Energy Carrier, AAC4) with glycolytic enzymes in the fibrous sheath of the human sperm flagellar principal piece. *Developmental Biology*. **302**: 463-476.
- Krisfalusi M, Miki K, Magyar PL and O'Brien DA. (2006) Multiple glycolytic enzymes are tightly bound to the fibrous sheath of mouse spermatozoa. *Biology of Reproduction*. **75**: 270-278.
- Kruger T.F., Menkveld R., Stander F.S., Lombard C.J., Van der Merwe J.P., Van Zyl J.A. & K. Smith (1986). Sperm morphologic features as a prognostic factor in in vitro fertilization. *Fertility and Sterility*. **46**: 1118-1123.
- Lin C, Hung P, VandeVoort CA, Miller MG. (2009) <sup>1</sup>H NMR to investigate metabolism and energy supply in rhesus macaque sperm. *Reproductive Toxicology*. **28**: 75-80.
- Lindemann CB, Orlando A and Kanous KS. (1992) The flagellar beat of rat sperm is organized by the interaction of two functionally distinct populations of dynein bridges with a stable central axonemal partition. *Journal of Cell Science*. **102**: 249-260.
- Lopata A, McMaster R, McBain JC and Johnston WI. (1978) In-vitro fertilization of preovulatory human eggs. *Journal of Reproduction and Fertility*. **52**: 339-342.
- Mahadevan MM, Miller MM and Moutos DM. (1997) Absence of glucose decreases human fertilization and sperm movement characteristics *in vitro*. *Human Reproduction*. **12**: 119-123.

- Makker K, Agarwal A and Sharma R. (2009) Oxidative stress & male infertility. *Indian Journal of Medical Research*. **129**: 357-367.
- Wassarman M. (1999) Mammalian Fertilization: Review Molecular Aspects of Gamete Adhesion, Exocytosis, and Fusion. *Cell*. **96**: 175-183.
- Meistrich ML, Mohapatra B, Shirley CR and Zhao M. (2003) Roles of transition nuclear proteins in spermiogenesis. *Cromosoma*. **111**: 483-488.
- Miki K, Qu W, Goulding EH, Willis WD, Bunch DO, Strader LF, Perreault SD, Eddy EM and O'Brien DA. (2004) Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase-S, a sperm-specific glycolytic enzyme, is required for sperm motility and male fertility. *Proceedings of the National Academy of Sciences (PNAS)*. **101**:16501-16506.
- Mukai C and Okuno M. (2004) Glycolysis plays a major role for adenosine triphosphate supplementation in mouse sperm flagellar movement. *Biology of Reproduction*. **71**: 540-547.
- Mundy AJ, Ryder TA and Edmonds DK. (1995) Asthenozoospermia and the human sperm mid-piece. *Human Reproduction*. **10**:116-119.
- Murad C, de Lamirande E, and Gagnon C. (1992) Hyperactivated motility is coupled with interdependent modifications at axonemal and cytosolic levels in human spermatozoa. *Journal of Andrology*. **13**: 323-331.
- Murdoch R.N. and White I.G. (1968) Studies of the Metabolism of Human Spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility*. **16**: 351-361.
- Nakada K, Sato A, Yoshida K, Morita T, Tanaka H, Inoue S, Yonekawa H and Hayashi J. (2006) Mitochondria-related male infertility. *Proceedings of the National Academy of Sciences (PNAS)*. **103**:15148-15153.

Nakamura N, Miranda-Vizuet A, Miki K, Mori C, and Eddy EM (2008) Cleavage of Disulfide Bonds in Mouse Spermatogenic Cell-Specific Type 1 Hexokinase Isozyme Is Associated with Increased Hexokinase Activity and Initiation of Sperm Motility. *Biology of Reproduction*. **79**: 537-545.

Nakamura N, Mori C and Eddy EM (2010) Molecular Complex of Three-Specific Isozymes Associated with the Mouse Sperm Fibrous Sheath: Hexokinase 1, Phosphofruktikinase M, and Glutathione S-Transferase mu class 5. *Biology of Reproduction*. **82**: 504-515.

Narisawa S., Hecht N.B., Goldberg E., Boatright K.M., Reed J.C. and Millán J.L. (2002) Testis-Specific Cytochrome c-Null Mice Produce Functional Sperm but Undergo Early Testicular Atrophy. *Molecular and Cellular Biology*. **22**: 5554-5562.

Nascimento JM, Shi LZ, Tam J, Chandsawangbhuwana C, Durrant B, Botvinick EL and Berns MW (2008) Comparison of glycolysis and oxidative phosphorylation as energy sources for mammalian sperm motility, using the combination of fluorescence and imaging, laser tweezers, and real-time automated tracking and trapping. *Journal of Cellular Physiology*. **217**: 745-751.

Nelson DL and Cox MM. (2004) Lehninger – Principles of Biochemistry. Fourth edition. Worth Publishers. New York. pp 527-566.

Odet F, Duan C, Willis WD, Goulding EH, Kung A, Eddy EM and Goldberg E. (2008) Expression of the gene for mouse lactate dehydrogenase C (Ldhc) is required for male fertility. *Biology of Reproduction*. **79**:26-34.

Oehninger S. and Franken D. (2006) Testing sperm manufacturing quality the sperm-zona binding assay in *The Sperm Cell: Production, Maturation, Fertilization, Regeneration*. 1ª edição. Cambridge University Press, UK. pp. 194-216.

- Pacey AA, Davies N, Warren MA, Barratt CLR and Cooke LD. (1995) Hyperactivation may assist human spermatozoa to detach from intimate association with the endosalpinx. *Human Reproduction*. **10**: 2603-2609.
- Palermo G, Joris H, Devroey P and Van Steirteghem AC. (1992) Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *Lancet*. **340**: 17-18.
- Peterson RN and Freund M (1969) Glycolysis by Washed Suspensions of Human Spermatozoa: Effect of Substrate, Substrate Concentration, and Changes in Medium Composition on the Rate of Glycolysis. *Biology of Reproduction*. **1**: 23
- Peterson RN and Freund M. (1970) ATP Synthesis and Oxidative Metabolism in Human Spermatozoa. *Biology of Reproduction*. **3**: 47-54.
- Peterson RN and Freund M. (1971) Glycolysis by Human Spermatozoa: Levels of Glycolytic Intermediates. *Biology of reproduction*. **5**: 221-227.
- Petit JM, Ratinaud MH, Cordelli E, Spano M and Julien R. (1995) Mouse Testis Cell Sorting According to DNA and Mitochondrial Changes During Spermatogenesis. *Cytometry*. **19**:304-312.
- Porter ME and Sale WS. (2000) The 9 + 2 Axoneme Anchors Multiple Inner Arm Dyneins and a Network of Kinases and Phosphatases that Control Motility. *The Journal of Cell Biology*. **151**: F37-F42.
- Rajender S., Rahul P., Mahdi A.A. (2010) Mitochondria, spermatogenesis and male infertility. *Mitochondrion*. **10**: 419-428.
- Ramalho-Santos J, Amaral A, Sousa AP, Rodrigues AS, Martins L, Baptista M, Mota PC, Tavares R, Amaral S and Gamboa S. (2007) Probing the Structure and Function of Mammalian Sperm using Optical and Fluorescence Microscopy. *In*

*Modern Research and Educational Topics in Microscopy*. FORMATEX, Extremadura. pp 394-402.

Ramalho-Santos J, Schatte G, and Moreno RD. (2002) Control of Membrane Fusion During Spermiogenesis and the Acrosome Reaction. *Biology of Reproduction*. **67**: 1043-1051.

Ramalho-Santos J, Varum S, Amaral S, Mota PC, Sousa AP and Amaral A. (2009) Mitochondrial functionality in reproduction: from gonads and gametes to embryos and embryonic stem cells. *Human Reproduction Update*. **15**: 553 - 572.

Ruiz-Pesini E, Diez C, Lapeña AC, Pérez-Martos A, Montoya J, Alvarez E, Arenas J, and López-Pérez MJ. (1998) Correlation of sperm motility with mitochondrial enzymatic activities. *Clinical Chemistry*. **44**: 1616-1620.

Ruiz-Pesini E, Diez-Sanchez C, Lopez-Perez MJ and Enriquez JA. (2007) The role of the mitochondrion in sperm function: is there a place for oxidative phosphorylation or is this a purely glycolytic process? *Current Topics in Developmental Biology*. **77**: 3-19.

Ruiz-Pesini E, Lapena AC, Diez-Sanchez C, Perez-Martos A, Montoya J, Alvarez E, Diaz M, Urries A, Montoro L, Lopez-Perez MJ, Enríquez JA. (2000) Human mtDNA haplogroups associated with high or reduced spermatozoa motility. *American Journal of Human Genetics*. **67**: 682-696.

Skakkebaek, N. E., Jorgensen, N., Main, K. M., Rajpert-De Meyts, E., Leffers, H., Andersson, A. M., Juul, A., Carlsen, E., Mortensen, G. K., Jensen, T. K. and Toppari, J. (2006) Is human fecundity declining? *International Journal of Andrology*. **29**: 2-11.



- Sousa A.P.M., Tavares R.S., de la Calle J.F.V., Figueiredo H., Almeida V., Almeida-Santos T., and Ramalho-Santos J. (2009) Dual use of Diff-Quik-like stains for the simultaneous evaluation of human sperm morphology and chromatin status. *Human Reproduction*. **24**: 28-36.
- St John JC, Jokhi RP and Barratt CL. (2005) The impact of mitochondrial genetics on male infertility. *International Journal of Andrology*. **28**: 65-73.
- Storey BT. (2008) Mammalian sperm metabolism: oxygen and sugar, friend and foe. *International Journal of Developmental Biology*. **52**: 427-437.
- Sutovsky P. and Gaurishankar M. (2006) Mammalian spermatogenesis and sperm structure: anatomical and compartmental analysis *in* The Sperm Cell: Production, Maturation, Fertilization, Regeneration. 1ªedição. Cambridge University Press, UK. pp. 1-30.
- Sutre D., Chow PYW and Martin ICA. (1979) Maintenance of Motility in Human Spermatozoa by Energy Derived through Oxidative Phosphorilation and Addition of Albumin. *Biology of Reproduction*. **20**: 505-510.
- Tombes RM and Shapiro BM (1985) Metabolite channeling: a phosphorylcreatine shuttle to mediate high energy phosphate transport between sperm mitochondrion and tail. *Cell*. **41**, 325–334.
- Turner RM. (2003) Tales From the Tail: What Do We Really Know About Sperm Motility?. *Journal of Andrology*. **24**: 790-803.
- Venkatesh S, Deecaraman M, Kumar R, Shamsi MB and Dada R. (2009) Role of reactive oxygen species in the pathogenesis of mitochondrial DNA (mtDNA) mutations in male infertility. *Indian Journal of Medical Research*. **129**: 127-137.

- Visconti, P. E. and Kopf, G. S. (1998) Regulation of protein phosphorylation during sperm capacitation. *Biology of Reproduction*. **59**: 1-6.
- Walker WH and Cheng J. (2005) FSH and testosterone signaling in Sertoli cells. *Reproduction*. **130**: 15-28.
- Wallace DC, Brown MD, Lott MT. (1999) Mitochondrial DNA variation in human evolution and disease. *GENE*. **238**: 211-230.
- Wallace DC. (1994) Mitochondrial DNA sequence variations in human evolution and disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **91**: 8739-8746.
- Westhoff D and Kamp G. (1997) Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase is bound to the fibrous sheath of mammalian spermatozoa. *Journal of Cell Science*. **110**: 1821-1829.
- WHO (1999). World Health Organization Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Sperm-Cervical Mucus Interaction, 4<sup>a</sup> Edição. *Cambridge University Press*, Cambridge, UK.
- Williams AC and Ford WC. (2001) The role of glucose in supporting motility and capacitation in human spermatozoa. *Journal of Andrology*. **22**: 680-695.
- Witters WL and Foley CW. (1976) Effect of selected inhibitors and methylene-blue on a possible phosphogluconate pathway in washed boar sperm. *Journal of Animal Science*. **44**: 159-163.
- Yan W. (2009) Male infertility caused by spermiogenic defects: Lessons from gene knockouts. *Molecular and Cellular Endocrinology*. **306**: 24-32.