

Apoptose em espermatozoides: uma nova abordagem na avaliação da viabilidade espermática

Apoptosis in spermatozoa: a new approach in sperm viability evaluation

Ivan Cunha Bustamante Filho^{1*}; José Frederico Straggiotti Silva²;
Maria Inês Mascarenhas Jobim³

Resumo

As biotécnicas aplicadas à reprodução animal desenvolvem-se a cada dia. Entretanto, as tecnologias empregadas e estudadas atualmente envolvem processos de grande estresse celular. A criopreservação é a técnica mais utilizada na conservação de gametas, embora esta metodologia ainda não esteja totalmente dominada em algumas espécies. A apoptose vem sendo vista como uma das causas da baixa viabilidade espermática pós-descongelamento. A presente revisão aborda novos conceitos da espermatogênese e resultados de pesquisas deste tipo de morte celular em células espermáticas.

Palavras-chave: Espermatozoide, espermatogênese, apoptose, criopreservação

Abstract

Animal reproduction biotechnics are developing day after day. However, almost every applied and studied technology are basically cellular stressful procedures. Cryopreservation is the most used technic for gamete conservation, although in some species this methodology is not efficiently applied. Apoptosis has been recognized as the one of the major causes of poor post-thaw sperm viability. This review presents new concepts about spermatogenesis and research findings on sperm apoptosis.

Key words: Spermatozoa, spermatogenesis, apoptosis, cryopreservation

Introdução

Com o desenvolvimento e aperfeiçoamento das biotécnicas reprodutivas utilizadas na produção animal, foram introduzidas novas metodologias de estudo das patologias do sistema reprodutor de machos. As atenções voltaram-se para a célula

espermática às quais foram associados casos de subfertilidade e infertilidade decorrentes de apoptose.

A importância fisiológica da apoptose abrange vários aspectos. Ela atua no equilíbrio do número de células germinativas, tendo papel fundamental na regressão estacional do testículo. A morte da célula

¹ Médico Veterinário, mestrando em Zootecnia – Produção Animal (Bolsista CAPES). Laboratório de Inseminação Artificial, Faculdade de Veterinária, UFRGS. Av. Bento Gonçalves, 9090, Agronomia, Porto Alegre, RS. 91540-000

² Docente. Setor de Tecnologia do Sêmen, Laboratório de Melhoramento Genético Animal, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, UENF. Av. Alberto Lamêgo, 2000, Horto, Campos dos Goytacazes, RJ. 28015-620.

³ Docente. Laboratório de Inseminação Artificial, Faculdade de Veterinária, UFRGS. Av. Bento Gonçalves, 9090, Agronomia, Porto Alegre, RS. 91540-000

* Autor para correspondência: bustamanteivan@yahoo.com.br

espermática por apoptose também é uma forma de controle da qualidade, onde, uma célula danificada por espécies reativas de oxigênio é eliminada de maneira segura, evitando assim, uma maior liberação de citoxinas pelas células lisadas.

Entretanto, a observação das conseqüências da apoptose testicular nos espermatozóides está claramente relacionada a um desequilíbrio deste fenômeno, resultando em danos severos à célula. (AGARWAL, et al. 2004). O presente artigo aborda o papel da apoptose na função testicular e na infertilidade masculina, com ênfase em seus aspectos bioquímicos.

Definição

Os primeiros estudos da apoptose foram realizados através das pesquisas de Kerr (1971), que induziu a atrofia no fígado de ratos pela ligação de vasos portais, o que levou a morte dos hepatócitos, caracterizada por alterações morfológicas peculiares como a diminuição do volume celular, ondulação das membranas plasmáticas, condensação da cromatina e, eventualmente, uma fragmentação em vesículas contendo organelas intactas. Esse fenômeno foi inicialmente chamado de necrose por encolhimento, porém um ano mais tarde, esse nome foi alterado para apoptose (KERN, 1972), palavra grega para a perda das folhas pelas árvores (VAN CRUCHTEN; VAN DEN BROECK, 2002).

Tratando-se de um tema bastante complexo e amplamente pesquisado, as definições dos tipos de morte celular ainda são controversas. Entretanto, a maioria dos pesquisadores chegaram a um consenso na definição da apoptose: um tipo de morte celular programada, induzida por estímulos intra e extracelulares (THORNBERRY; LAZEBNIK, 1998; HENGARTNER, 2000; LEWIN, 2001; VAN CRUCHTEN; VAN DEN BROECK, 2002; PAASCH et al., 2004; SAID et al., 2004).

A morte celular pode ocorrer de duas formas, por necrose ou por apoptose (VAN CRUCHTEN; VAN

DEN BROECK, 2002). A necrose é um processo decorrente de injúria celular ou tecidual, em que as células sofrem agressões físicas e/ou químicas e degeneram-se, e o seu rompimento culmina com a liberação dos conteúdos citoplasmáticos. O resultado desse processo é a instalação de intensa reação inflamatória local. Na apoptose não há extravasamento do conteúdo citoplasmático, pois a célula inicia um processo de desestruturação (LEWIN, 2001). Os estudos iniciais da apoptose caracterizaram os aspectos morfológicos, envolvendo a condensação da cromatina, intensa fragmentação do DNA, perda de volume celular, formação de protuberâncias na membrana plasmática e formação de corpos apoptóticos, que são fagocitados por macrófagos (ou células adjacentes). É um processo sinalizado, em que a resposta inflamatória não é desencadeada (LEWIN, 2001), e a cada dia são propostas novas interações com o envolvimento de inúmeras proteínas.

Atualmente, vários mecanismos inter e intracelulares envolvidos na morte celular por apoptose foram identificados, dividindo a apoptose em dois subtipos: a clássica e a independente de caspases. As caspases são enzimas que estão envolvidas na via apoptótica, atuando em diversos pontos como indutoras (caspase-8, -9 e -10) ou como efetoras, atuando diretamente nas alterações celulares (caspase-3, -6, -7) (THORNBERRY; LAZEBNIK, 1998; LEWIN, 2001).

Os principais métodos de estudo da ocorrência de apoptose são: (1) morfologia celular (ALLAN; HARMON; ROBERTS, 1998); (2) “DNA laddering”, formação de bandas de DNA de múltiplos tamanhos em gel de agarose, decorrente da clivagem internucleossômica do DNA (WYLLIE, 1980); (3) identificação de fosfatidilserina na superfície externa da membrana plasmática com Anexina V (HENRIKSEN; PARVINEN, 1998) e (4) TUNEL (TdTmediated deoxyuridine triphosphate nick end-labeling) que é marcação para identificação de fragmentação de cromatina (GAVRIELI; SHERMAN; BEN-SASSON, 1992).

A apoptose na célula espermática

Diversos estudos demonstram a presença de apoptose em espermatozóides (BACCETTI; COLLODEL; PIOMBONI, 1996; LEVY; SEIFER-AKNIN, 2001; ROWLAND et al., 2003). Uma alta incidência de células com características ultraestruturais de apoptose em ejaculados de homens inférteis e estéreis foi descrita por Baccetti, Collodel e Piomboni (1996). Posteriormente, foi observado que estas alterações são freqüentes em patologias que evidenciam imaturidade morfogênica, como varicocele e criptorquidismo, estando presentes também em casos de infecção (BACCETTI et al., 2002).

Os primeiros estudos identificaram alterações no espermatozóide de homens inférteis ou subférteis, semelhantes às características de apoptose em células somáticas. Foi demonstrado que os marcadores celulares e moleculares também eram os mesmos (TUNEL, Anexina V, DNA "laddering"). Desde então, busca-se determinar quais vias induzem este tipo de morte celular; sabe-se que vias caspase-dependentes (clássica) (SAID et al., 2004; PAASCH et al., 2004) e vias caspases-independentes estão envolvidas (WENG et al., 2001; MORSHEDI et al., 2003).

Pesquisas que buscavam respostas celulares para patologias reprodutivas mostraram que a apoptose ocorre fisiologicamente no parênquima testicular, mais especificamente durante a espermatogênese (SANTOS, 1999; OOSTERHUIS et al., 2000). A apoptose é considerada um fenômeno fisiológico no parênquima testicular, sendo sugerida como forma de controle da quantidade de células germinativas e também da maturação de células defeituosas, que poderiam sofrer espermição (YIN et al., 1998; HENINGER et al., 2004). A morte de células germinativas na espermatogênese normal tem papel importante na produção espermática (ANZAR et al., 2002). Aproximadamente 25 a 75% dos espermatozóides em formação degeneram e morrem no parênquima testicular dos mamíferos adultos (YOUNG; NELSON, 2001).

A íntima relação entre a espermatogênese e a apoptose foi estudada por Cagan (2003). Ensaios com inibidores de caspases resultaram em má formação espermática (durante a espermição) e levou a esterilidade em *Drosophila*. O autor propõe que um processo dependente de caspase é fundamental para a conclusão da espermatogênese. Seria a apoptose necessária para a formação de gametas masculinos nessa espécie?

Heninger et al. (2004), abordaram a apoptose como fenômeno fisiológico no parênquima testicular de equinos normozoospermicos. Demonstraram que espermatogônias e espermátocitos foram os tipos celulares mais marcados pelo ensaio TUNEL (para fragmentação de DNA). Entretanto, um pequeno número de espermátides redondas e alongadas foram marcadas, devido à compactação do DNA nessas células e/ou à baixa produção de mRNA, necessária para a ocorrência da apoptose.

Vias de apoptose propostas para células espermáticas

A maioria das células do organismo são capazes de sofrer morte celular programada, mas os mecanismos de regulação desse processo nem sempre são os mesmos e, embora existam diferentes vias intracelulares, essas resultam de uma seqüência de eventos comuns (HSUEH; EISENHAUER; CHUN, 1996).

Para células espermáticas foi proposto o modelo de morte induzida, onde alterações endócrinas levam à secreção do ligante do receptor de morte Fas (FasL) pelas células de Sertoli (Fig. 1). O receptor Fas é uma proteína de superfície celular que pertence à família dos receptores TNF (tumor necrosis factor) e NGF (nerve growth factor). O sinal apoptótico induzido por Fas é iniciado quando um ligante de Fas se une ao receptor, o que dispara uma via iniciada por caspase-8, que culminará com a ativação de caspases -3, -6, e -7, envolvidas com a fragmentação de DNA, inibição do reparo

cromossômico, murchamento e fragmentação celular (THORNBERRY; LAZEBNIK, 1998; PAASCH et al., 2004). Após a ativação da Fas pelo ligante FasL, a degradação do DNA ocorre dentro de 3 horas e a célula pode estar morta dentro de aproximadamente 5 horas (NAGATA, 1996).

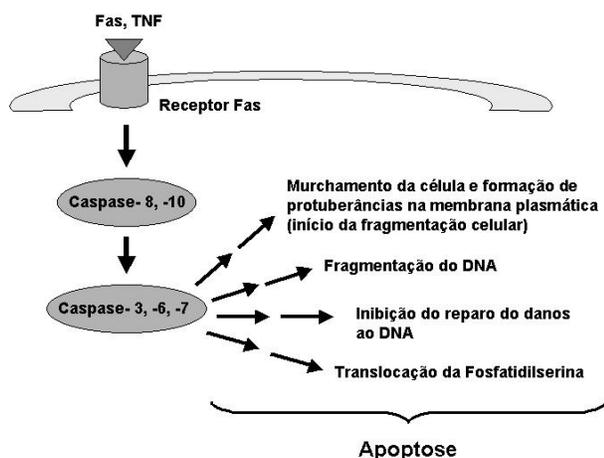


Figura 1. Início da apoptose via receptor Fas (adaptado de Thornerry e Lazebnik, 1998).

Um dos eventos desse fenômeno é a exteriorização de fosfatidilserina (PS), sinal esperado pela célula de Sertoli para a fagocitose da célula alvo (Fig. 2). Células de Sertoli de ratos fagocitam células espermatogênicas degeneradas *in vitro*, devido ao reconhecimento da fosfatidilserina na membrana plasmática externa (SANTOS, 1999; SHIRATSUSHI et al., 1999, YOUNG; NELSON, 2001). Falhas na fagocitose das células apoptóticas resultariam em um alto número de células anormais no ejaculado e, como consequência, baixa fertilidade (YIN et al., 1998; SAKKAS; MARIETHOZ; JOHN, 1999).

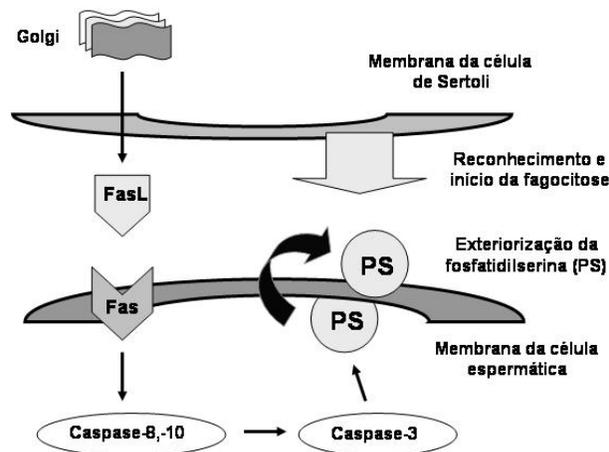


Figura 2. Mecanismo proposto para controle do número de células produzidas na espermatogênese e para a eliminação de células defeituosas (adaptado de Young e Nelson, 2001).

Em discordância, recentes estudos sobre a desorganização dos fosfolipídios da membrana por ação de bicarbonato, mostraram que a apoptose não está relacionada com a exposição de fosfatidilserina (e também fosfatidiletanolamina) na membrana externa de células espermáticas maduras (GADELLA; VAN GESTEL, 2004). Foi demonstrado também que (1) pan-inibidores de caspases não inibiram o efeito do bicarbonato na desorganização fosfolipídica da membrana; (2) sinais de dano mitocondrial e/ou de cromatina não foram detectados após estimulação com bicarbonato (GADELLA; HARRISON, 2002); (3) foram detectadas caspases efetoras em ejaculado humano, mas somente em resíduos de citoplasma de espermatozoides imaturos (DEVRIES et al., 2003); (4) altas doses de indutores de apoptose (ciclohexamida e estaurosporina) não induziram o desarranjo fosfolipídico (GADELLA; HARRISON, 2002). Estes resultados contrariam com uma das principais metodologias de estudo da apoptose (Anexina V), mostrando que muito, ainda, deve ser feito para a elucidação da questão.

A cascata apoptótica é muito complexa, pois quase todas as proteínas envolvidas estão presentes no citosol, apenas esperando para serem ativadas. Para que nenhuma proteína pró-apoptótica seja ativada inadvertidamente, existem diversos pontos de inibição ao longo das vias apoptóticas. Nesses pontos atuam as chamadas proteínas anti-apoptóticas, que tem importância crucial para a célula (THORNBERRY; LAZEBNIK, 1998). O proto-oncogene Bcl-2 aumenta a sobrevivência celular pela supressão da apoptose. Porém, alguns membros da família Bcl-2 têm efeito oposto e atuam como promotores da apoptose. A Bcl-2 é uma proteína de membrana localizada na bainha mitocondrial interna, na membrana nuclear externa e no retículo endoplásmico liso e rugoso. A associação com a membrana mitocondrial faz com que Bcl-2 exerça seu papel, mantendo a polarização da membrana. O equilíbrio entre os membros pró e anti-apoptóticos da família Bcl-2 é crítico para a sobrevivência celular (ADAMS; CORY, 1998; PAASCH et al., 2004).

As proteínas apoptóticas Bax e Bak são ativadas via p53 e caspase-2 após dano no DNA (Figura 3). Essas proteínas atuarão despolarizando a mitocôndria, o que resulta na liberação de diversos agentes apoptóticos, entre eles o citocromo c, que junto com a caspase-9 e Apaf-1, formarão o apoptossomo, capaz de ativar outras caspases efetoras (SANTOS, 1999; CONCANNON; GORMAN; SAMALI, 2003).

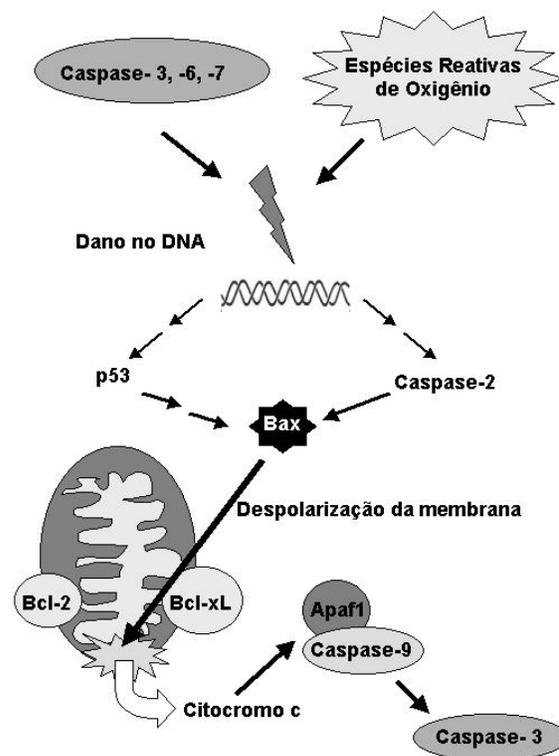


Figura 3. Via mitocondrial da apoptose a partir de dano na cromatina. Com liberação de citocromo c decorrente da despolarização da membrana mitocondrial, forma-se o apoptossomo (citocromo c + Apaf1 + Caspase-9) que ativará a caspase 3 (adaptado de Agarwal, Saleh e Bedaiwy, 2003).

Relação hormonal e fotoperiodismo

Na estação de monta, os testículos de mamíferos domésticos devem ser totalmente funcionais, com constantes ciclos de desenvolvimento e maturação celular (YOUNG; NELSON, 2001). Entretanto, durante a transição entre estações de monta e estação de repouso, a maioria dos machos de espécies que respondem ao fotoperiodismo, sofrem atrofia testicular da ordem de 40 a 90%. As células diminuem o tamanho, sendo também aumentada a taxa de morte celular de espermátides, espermatócitos, células de Sertoli e de Leydig, reduzindo o volume testicular (YOUNG; NELSON, 2001). O mecanismo esquematizado na figura 2, é proposto por esses autores como forma de controlar o volume testicular via apoptose.

A apoptose fisiológica tem papel fundamental no processo de regressão testicular, ocorrendo em espécies sensíveis ao fotoperiodismo. A sazonalidade reprodutiva é um fenômeno neuroendócrino, logo, hormônios como testosterona (T), hormônio folículo estimulante (FSH) e hormônio luteinizante (LH) vêm sendo relacionados com a apoptose em células espermáticas. A privação de T em ratos induz a apoptose nos testículos, sendo que sua re-introdução é capaz de reduzir a morte celular, em algumas situações. Além disso, a espermatogênese e esteroidogênese são dependentes da secreção de gonadotrofinas, e a diminuição das concentrações de FSH e LH induz a atrofia testicular pelo aumento da morte celular por apoptose (NANDI; BARNERJEE; ZIRKIN, 1999).

A intensa interação endócrina com a apoptose nas células espermáticas foi comprovada por Shetty, Marathe e Dighe (1996). Em seu estudo, ratos foram hipofisectomizados e FSH exógeno foi administrado, levando à supressão da fragmentação de DNA, por apoptose no testículo. Posteriormente, foi administrado antisoro de FSH, reiniciando a apoptose nas células germinativas, em 24 horas.

Apoptose patológica: Conseqüências na baixa qualidade seminal

Como todo sistema complexo, a apoptose fisiológica nos testículos também está propensa a ter falhas em algumas de suas fases ou passos, o que contribuiria para a má qualidade do sêmen (YIN et al., 1998). O que é confirmado por Irvine et al. (2000), quando observaram uma proporção significativa de dano na cromatina em espermatozoides de amostras de homens inférteis.

Weng et al. (2001) relataram pela primeira vez a identificação de caspase-3 em espermatozoide humano. Foram correlacionados altos níveis de caspase-3 ativada com a translocação de fosfatidilserina e a fragmentação de DNA em pacientes inférteis e em amostras com baixa motilidade.

A relação entre apoptose espermática e infertilidade em homens foi demonstrada por Wang et al. (2002). Foi observada ativação de caspase-3 na peça intermediária do espermatozoide, juntamente com fragmentação de DNA em sêmen de baixa motilidade em homens inférteis. Alterações na polarização da membrana mitocondrial estão envolvidas na formação do apoptossomo, responsável pela ativação da caspase-3. Com isso, a peça intermediária poderia representar o foco inicial da apoptose no espermatozoide (via da mitocôndria), sugerindo que mecanismos apoptóticos caspase-dependentes pudessem ser originados da gota citoplasmática ou bainha mitocondrial, resultando em fragmentação de DNA (WANG et al., 2002).

Uma maior ocorrência de apoptose em sêmen de homens subfêrteis, e a avaliação da atividade de caspases foi indicada como marcador diagnóstico para qualidade do sêmen, proporcionando assim, um parâmetro mais acurado aos exames andrológicos (OOSTERHUIS et al., 2000; MORSHEDI et al., 2003)

Sakkas, Mariethoz e John (1999), procuraram identificar a proteína de superfície Fas, que atua como um receptor de morte, disparando a apoptose na célula. Foram avaliados sêmen de homens férteis e subfêrteis, sendo que 96,8% dos homens normais tinham menos de 10% de espermatozoides marcados com a Fas. Em contraste, 56,8% das amostras oligozoospermicas continham mais de 10% de células imunomarcadas com anticorpo anti-Fas humano. Com estes resultados, os autores sugerem que a apoptose é um mecanismo de controle da espermatogênese, e a presença de células marcadas com Fas é indicativo para funcionamento deficiente desse controle, que teria como funções regular o número de células germinativas e evitar a espermição de células defeituosas .

De forma semelhante, Shen et al. (2002), sugerem que a apoptose em esperma maduro é iniciada na espermatogênese, onde alguns espermatozoides são marcados para morrer via apoptose, e a sobrevivência

destes, colaboraria para um sêmen de baixa qualidade, sugerindo que a morte celular programada atuaria como um instrumento de eliminação e/ou seleção de células mal formadas.

Apoptose e criopreservação

Podem existir diversas razões para a indução de apoptose no sêmen congelado. Foi observado que o número de espermatozoides apoptóticos aumentou 40% durante a criopreservação no sêmen de touros estudados (ANZAR et al., 2002). Durante a criopreservação, a membrana plasmática é desestabilizada devido às baixas temperaturas e altas concentrações de sais, levando a alterações nos seus componentes lipídicos. Em adição, a toxicidade ao glicerol e respostas imunes devido à gema do ovo no diluidor do sêmen, causam alterações na membrana plasmática. Sob condições normais, a assimetria da membrana é mantida por translocadores de fosfolipídios (flipases), mas a congelação/descongelação pode danificar as flipases presentes na membrana, facilitando a translocação da fosfatidilserina levando, assim, à apoptose da célula espermática (ANZAR et al., 2002).

O processo congelação/descongelação também pode causar danos à cromatina, facilitando a mortalidade embrionária precoce, na fertilização *in vitro* (FIV) ou injeção intracitoplasmática de espermatozoide (ICSI). Para a realização destas técnicas, são necessários espermatozoides integros, pois a utilização de espermatozoides com a cromatina danificada pode comprometer as taxas de sucesso destas biotécnicas (WATSON, 2000; HENKEL et al., 2003). Resultados recentes mostraram que espermatozoides com DNA danificado são capazes de fertilizar o ovócito, entretanto, quando o genoma paterno é requisitado, o desenvolvimento embrionário cessa (HENKEL et al., 2003).

Assim como as células somáticas, os espermatozoides vivem em aerobiose, enfrentando as espécies reativas de oxigênio, que causam a peroxidação dos fosfolipídeos da membrana,

afetando, portanto, a função celular. O espermatozoide é particularmente susceptível ao dano por radicais de oxigênio (produzido em grande quantidade por leucócitos seminais e por ele mesmo), porque sua membrana plasmática contém grandes quantidades de ácidos graxos poli-insaturados (AGARWAL; SALEH; BEDAIWY, 2003). Adiciona-se a isto, a baixa concentração citoplasmática de enzimas com ações antioxidantes (WATSON, 2000).

O estresse oxidativo não só ataca a fluidez da membrana citoplasmática do espermatozoide, como também danifica o DNA nuclear (AITKET, 1999; HENKEL et al., 2003; MOUSTAFA et al., 2004). A ação deletéria no DNA pode acelerar o processo de apoptose (Fig. 3), acarretando o declínio no número de células do ejaculado, associado à infertilidade e deterioração da qualidade do sêmen. Essa ação danosa ao DNA, causando sua fragmentação, tem grande importância, principalmente se o sêmen for usado em técnicas de reprodução assistida (AGARWAL; SALEH; BEDAIWY, 2003; ALVAREZ, 2003; AGARWAL; SAID, 2005).

Estudos mostraram maior nível de radicais de oxigênio nos espermatozoides humanos após a descongelação (DURU et al., 2001). Como consequência, a peroxidação lipídica aumentou após o processo de congelação/descongelação do sêmen, podendo desencadear a apoptose. Pesquisas com sêmen bovino sugeriram que a produção de espécies reativas de oxigênio, durante a congelação e descongelação prejudicaram a qualidade dos espermatozoides (BILODEAU et al., 2000; CHATTERJEE; GAGNON, 2001).

Entretanto, a baixa fertilidade encontrada pós-criopreservação não foi atribuída ao processo de apoptose, mas sim a proteases e outras citotoxinas, resultantes da necrose de parte dos espermatozoides (ANZAR et al., 2002). Talvez esta seja a razão da pequena utilização de antioxidantes nos diluentes de sêmen, pois ainda é questionado o papel benéfico destes agentes (WATSON, 2000; AGARWAL, 2004).

Uma das abordagens do estudo da apoptose na criopreservação de espermatozoides foi a adição de agentes inibidores da atividade das caspases. Peter e Linde-Forsberg (2003) pesquisaram o efeito da adição do inibidor geral de caspases, z-VAD-fmk, no diluidor de sêmen canino para congelamento. Seus resultados, porém, não demonstraram benefício na motilidade, integridade de membrana e de acrossoma pós-congelamento, nas concentrações usadas. Entretanto, não foram avaliados outros marcadores para apoptose, utilizados em diversos estudos.

Considerações Finais

O assunto abordado é recente, mesmo para a andrologia humana, mostrando que muitas dúvidas necessitam ser esclarecidas, para um maior domínio desse fenômeno. Esse conhecimento pode possibilitar uma manipulação bioquímica e farmacológica mais acurada dos eventos celulares nos túbulos seminíferos, melhorando a qualidade do sêmen ejaculado.

Para a Medicina Veterinária, esses estudos podem fornecer novos parâmetros bioquímicos e moleculares, aperfeiçoando a seleção de reprodutores com melhor potencial reprodutivo e colaborando no diagnóstico clínico de patologias ligadas à reprodução.

Referências

ADAMS, J. M.; CORY, S. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science*, Washington, v. 281, p. 1322-1326, 1998.

AGARWAL, A.; NALLELLA, K. P.; ALLAMANENI, S. S. R.; SAID, T. M. Role of antioxidants in treatment of male infertility: an overview of the literature. *Reproductive Biomedicine Online*, Cambridge, v. 8, n. 6, p. 616-627, 2004.

AGARWAL, A.; SAID, T. M. Oxidative stress, DNA damage and apoptosis in male infertility: a clinical approach. *BJU International*, Oxford, v. 95, n. 4, p. 503-507, 2005.

AGARWAL, A.; SALEH, R.; BEDAIWY, M. A. Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. *Fertility And Sterility*, Birmingham, v. 79, p. 829-843, 2003.

AITKEN, R. J. The Amoroso Lecture. The human spermatozoon—a cell in crisis? *Journal of Reproduction And Fertility*, Cambridge, v. 115, p. 1-7, 1999.

ALLAN, D. J.; HARMON, B. V.; ROBERTS, S. A. Spermatogonial apoptosis has three morphologically recognizable phases and shows no circadian rhythm during normal spermatogenesis. *Cell Proliferation*, Oxford, v. 25, p. 241-250, 1998.

ALVAREZ, J. G. DNA fragmentation in human spermatozoa: significance in the diagnosis and treatment of infertility. *Minerva Gynecologica*, Turin, v. 55, p. 233-239, 2003.

ANZAR, M.; LIWEI, H.; BURH, M. M.; KROETSCH, T. G.; PAULS, K. P. Sperm apoptosis in fresh and cryopreserved bull semen detected by flow cytometry and its relationship with fertility. *Biology of Reproduction*, Champaign, v. 66, p. 354-360, 2002.

BACCETTI, B.; COLLODEL, G.; PIOMBONI, P. Apoptosis in human ejaculated sperm cells. *Journal of Submicroscopic Cytology And Pathology*, Bologna, v. 28, p. 587-596, 1996.

BACCETTI, B.; CAPITANI, S.; COLLODEL, G.; STREHLER, E.; PIOMBONI, P. Recent advances in human sperm pathology. *Contraception*, Stoneham, v. 65, p. 283-287, 2002.

BILODEAU, J. F.; CHATTERJEE, S.; SIRARD, M. A.; GAGNON, C. Levels of antioxidant defenses are increased in bovine spermatozoa after a cycle of freezing and thawing. *Molecular Reproduction And Development*, New York, v. 55, p. 282-288, 2000.

CAGAN, R. L. Spermatogenesis: Borrowing the apoptotic machinery. *Current Biology*, London, v. 13, p. 600-602, 2003.

CHATTERJEE, S.; GAGNON, C. Production of reactive oxygen species by spermatozoa undergoing cooling, freezing, and thawing. *Molecular Reproduction and Development*, New York, v. 59, n. 4, p. 451-458, 2001.

CONCANNON, C. G.; GORMAN, A. M.; SAMALLI, A. On the role of Hsp27 in regulating apoptosis. *Apoptosis*, Netherlands, v. 8, p. 61-70, 2003.

deVRIES, K. J.; WIEDMER, T.; SIMS, P. J.; GADELLA, B. M. Caspase-independent exposure of aminophospholipids and tyrosine phosphorylation in bicarbonate responsive human sperm cells. *Biology of Reproduction*, Madison, v. 68, n. 6, p. 2122-2134, 2003.

DURU, N. K.; MORSHEDI, M.; SCHUFFNER, A.; OEHNINGER, S. Cryopreservation-thawing of fractionated human spermatozoa and plasma membrane translocation of phosphatidylserine. *Fertility and Sterility*, New York, v. 75, n. 2, p. 263-268, 2001.

- GADELLA, B. M.; HARRISON, R. A. P. Capacitation induces cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate-dependent, but apoptosis-unrelated, exposure of aminophospholipids at the apical head plasma membrane of boar sperm cells. *Biology of Reproduction*, Madison, v. 67, p. 340-350, 2002.
- GADELLA, B. M.; van GESTEL, R. A. Bicarbonate and its role in mammalian sperm function. *Animal Reproduction Science*, Amsterdam, v. 82-83, p. 307-319, 2004.
- GAVRIELI, Y.; SHERMAN, Y.; BEN-SASSON, S. A. Identification of Programmed Cell Death In Situ via Specific Labeling of Nuclear DNA Fragmentation. *Journal of Cell Biology*, New York, v. 119, n.3, p. 493-501, 1992.
- HENGARTNER, M. O. The Biochemistry of apoptosis. *Nature*, London, v. 407, p. 770-776, 2000.
- HENINGER, N. L.; STAUB, C.; BLANCHARD, T. L.; JOHNSON, L.; VARNER, D. D.; FORREST, D. W. Germ cell apoptosis in the testes of normal stallions. *Theriogenology*, New York, v. 62, p. 283-297, 2004.
- HENKEL, R.; KIERSPEL, E.; HAJIMOHAMMAD, M.; STALF, T.; HOOGENDIJK, C.; MEHNERT, C.; MENKVELD, R.; SCHILL, W. B.; KRUGER, T. F. DNA fragmentation and assisted reproduction technology. *Reproductive Biomedicine Online*, Cambridge, v. 7, p. 477-484, 2003.
- HENRIKSEN, K.; PARVINEN, M. Stage-specific apoptosis of male germ cells in the rat: mechanisms of cell death studied by supravital squash preparations. *Tissue Cell*, Essex, v. 30, n. 6, p. 692-701, 1998.
- HSUEH, A. J. W.; EISENHAUER, K.; CHUN, S. Y.; HSU, S. Y.; BILLIG, H. Gonadal cell apoptosis. *Recent Progress in Hormone Research*, Bethesda, v. 51, p. 433-456, 1996.
- IRVINE, D. S.; TWIGG, J. P.; GORDON, E. L.; FULTON, N.; MILNE, P. A.; AITKEN, R. J. DNA integrity in human spermatozoa: Relationships with semen quality. *Journal of Andrology*, Lawrence, v. 21, p. 33-44, 2000.
- KERR J. F. R. Shrinkage necrosis: a distinct mode of cell death. *Journal of Pathology*, Sussex, v. 105, p. 13-20, 1971.
- KERR J. F. R.; WYLLIE, A. H.; CURRIE, A. R. Apoptosis: basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics. *British Journal of Cancer*, Scotland, v. 26, n. 4, p. 239-257, 1972.
- LEWIN, B. *Genes VII*. 7. ed. Porto Alegre: Artes Médicas, 2001. 1247 p.
- LEVY, R.; SEIFER-AKNIN, I. Apoptosis during spermatogenesis and in ejaculated spermatozoa: importance for fertilization. *Annales de Biologie Clinique*, Montrouge, v. 59, n. 5, p. 531-545, 2001.
- MORSHEDI, M. S.; TAYLOR S. L.; WENG, S. L.; DURAN, H.; BEEBE, S. J.; OEHNINGER, S. Roles for caspases in human spermatozoa: a marker for sperm quality? *Fertility and Sterility*, New York, v. 80, p. 30-31, 2003.
- MOUSTAFA, M. H.; SHARMA, R. K.; THORNTON, J.; MASCHA, E.; ABDEL-HAFEZ, M. A.; THOMAS, A. J.; AGARWAL, A. Relationship between ROS production, apoptosis and DNA denaturation in spermatozoa from patients examined for infertility. *Human Reproduction*, Oxford, v. 19, p. 129-138, 2004.
- NAGATA, S. Apoptosis mediated by the Fas system. *Progress in Molecular and Subcellular Biology*, Osaka, v. 16, p. 87-103, 1996.
- NANDI, S.; BARNERJEE, P. P.; ZIRKIN, B. R. Germ cell apoptosis in testes of Sprague Dawley rats following testosterone withdrawal by ethane 1,2-dimethanesulfonate administration: relationship to Fas? *Biology of Reproduction*, Madison, v. 61, p. 70-75, 1999.
- OOSTERHUIS, G. J. E.; MULDER, A. B.; KALSBECK-BATENBURG, E.; LAMBALK, C. B.; SCHOEMAKER, J.; VERMES, I. Measuring apoptosis in human spermatozoa: a biological assay for semen quality. *Fertility and Sterility*, New York, v. 74, n. 2, p. 245-250, 2000.
- PAASCH, U.; GRUNEWALD, S.; AGARWAL, A.; GLANDERA, H. J. Activation pattern of caspases in human spermatozoa. *Fertility and Sterility*, New York, v. 81, p.802-809, 2004.
- PETER, A. T.; LINDE-FORSBERG, C. Efficacy of the anticaspase agent zVAD-fmk on post-thaw viability of canine spermatozoa. *Theriogenology*, New York, v. 59, n. 7, p. 1525-1532, 2003.
- ROWLAND, S. C.; JACOBSON, J. D.; PATTON, W. C.; KING, A.; CHAN, P. J. Dual fluorescence analysis of DNA apoptosis in sperm. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, Louis, v. 188, n. 5, p. 1156-1157, 2003.
- SAID, T. M.; PAASCH, U.; GLANDER, H. J.; AGARWAL, A. Role of caspases in male infertility. *Human Reproduction Update*, Oxford, v. 10, p. 39-51, 2004.
- SAKKAS, D.; MARIETHOZ, E.; ST. JOHN J. C. Abnormal Sperm Parameters in Humans Are Indicative of an Abortive Apoptotic Mechanism Linked to the Fas-Mediated Pathway. *Experimental Cell Research*, San Diego, v. 251, n. 2, p. 350-355, 1999.
- SANTOS, R. L. Morte celular por apoptose no testículo. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, Belo Horizonte, v. 23, p. 486-499, 1999.
- SHEN, H. M.; DAI, J.; CHIA, S. E.; LIM, A.; ONG, C. N. Detection of apoptotic alterations in sperm in subfertile patients and their correlations with sperm quality. *Human Reproduction*, Oxford, v. 17, n. 5, p. 1266-1273, 2002.

SHETTY, J.; MARATHE, G. K.; DIGHE, R. R. Specific immunoneutralization of FSH leads to apoptotic cell death of the pachytene spermatocytes and spermatogonial cells in the rat. *Endocrinology*, Bethesda, v. 137, n. 5, p. 2179-2182, 1996.

SHIRATSUCHI, A.; KAWASAKI, Y.; IKEMOTO, M.; ARAI, H.; NAKANISHI, Y. Role of class B scavenger receptor type I in phagocytosis of apoptotic rat spermatogenic cells by Sertoli cells. *Journal of Biological Chemistry*, Bethesda, v. 274, n. 9, p. 5901-5908, 1999.

THORNBERRY, N. A.; LAZEBNIK, Y. Caspases: enemies within. *Science*, Washington, v. 281, p. 1312-1316, 1998.

VAN CRUCHTEN, S.; VAN DEN BROECK, W. Morphological and biochemical aspects of apoptosis, oncosis and necrosis. *Anatomia Histologia Embryologia*, Berlin, v. 31, n. 4, p. 214-223, 2002.

WANG, G. R.; ZHOU, Z. D.; GE, Z. M.; ZHAO, M. J. Preliminary investigation of relationship between sperm apoptosis and male infertility. *Zhonghua Nan Ke Xue*, Beijing, v. 8, p. 25-27, 2002.

WATSON, P. F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal Reproduction Science*, Amsterdam, v. 60, p. 481-492, 2000.

WENG, S. L.; SCHUFFNER, A.; MORSHEDI, M.; BEEBE, S.; TAYLOR, S.; OEHNINGER, S. C. Caspase-3 activity is present at low levels in ejaculated human spermatozoa. *Fertility and Sterility*, New York, v. 76, n. 3, p. 193, 2001.

WYLLIE, A. H. Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature*, London, v. 284, p. 555-556, 1980.

YIN, Y. Z.; STAHL, B. C.; DeWOLF, W. C.; MORGENTALER, A. p53-mediated germ cell quality control in spermatogenesis. *Developmental Biology*, San Diego, v. 204, p. 165-171, 1998.

YOUNG, K. A.; NELSON, R. J. Mediation of seasonal testicular regression by apoptosis. *Reproduction*, Cambridge, v. 122, n. 5, p. 677-685, 2001.