

# RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)  
autor(a), o texto completo desta tese  
será disponibilizado somente a partir  
de 25/02/2021.



**unesp**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**  
**“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”**  
Campus de Botucatu



# CORRELAÇÕES ESPERMÁTICAS E CARACTERIZAÇÃO DE UM POTENCIAL BIOMARCADOR DE FERTILIDADE EM SERES HUMANOS: PROTEÍNA ESPERMÁTICA SP22

**JOSIANE DE LIMA ROSA**

Tese apresentada ao Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, UNESP, como requisito para a obtenção do título de Doutora junto ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração Biologia Celular, Estrutural e Funcional

*Wilma De Grava Kempinas*

**BOTUCATU – SP**  
**2019**

Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada  
Distrito de Rubião Júnior, s/n CEP 18618-000 Cx Postal 510 Botucatu/SP Brasil  
Telefone: 14 3811-6148 Fax: 14 3811-6148 e-mail: posgraduacao@ibb.unesp.br



**unesp**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**  
**“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”**  
Campus de Botucatu



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**

**“Julio de Mesquita Filho”**

**INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU**

**CORRELAÇÕES ESPERMÁTICAS E CARACTERIZAÇÃO DE  
UM POTENCIAL BIOMARCADOR DE FERTILIDADE EM  
SERES HUMANOS: PROTEÍNA ESPERMÁTICA SP22**

**JOSIANE DE LIMA ROSA**

**PROFA. DRA. WILMA DE GRAVA KEMPINAS**

Tese apresentada ao Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, UNESP, como requisito para a obtenção do título de Doutora junto ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração Biologia Celular, Estrutural e Funcional

*Wilma De Grava Kempinas*

**BOTUCATU – SP**  
**2019**

Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada  
Distrito de Rubião Júnior, s/n CEP 18618-000 Cx Postal 510 Botucatu/SP Brasil  
Telefone: 14 3811-6148 Fax: 14 3811-6148 e-mail: posgraduacao@ibb.unesp.br

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Rosa, Josiane de Lima.

Correlações espermáticas e caracterização de um potencial biomarcador de fertilidade em seres humanos: proteína espermática SP22 / Josiane de Lima Rosa. - Botucatu, 2019

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Wilma De Grava Kempinas

Capes: 20602006

1. Análise do sêmen. 2. Fertilidade. 3. Citometria de fluxo. 4. Proteínas.

Palavras-chave: Análises seminais convencionais; Análises seminais funcionais; Biomarcador de fertilidade masculina; Citometria de fluxo; SP22.

*Dedicatória*

*À minha família,  
Que sempre foram meus maiores exemplos de perseverança e dedicação.  
Jamais esquecerei todo apoio, incentivo e amor que recebi de vocês.  
Sem isso, com certeza, não chegaria onde hoje estou.  
Todas as dificuldades que enfrentei durante esta jornada  
são recompensadas quando em um abraço sinto  
a felicidade e o orgulho de vocês.  
Por isso e muito mais eu dedico a vocês este trabalho.  
Amo vocês eternamente.*

*Agradecimientos*

*Aos meus pais, Joaquim e Célia, que sempre me fazem sentir capaz de ir além. Sei que por muitas vezes quase os enlouqueci, mas dividir as minhas aflições com vocês me deixa mais leve e confiante. Obrigada pelas orações, conselhos e acima de tudo pelos puxões de orelha quando só conseguia enxergar coisas negativas. Vocês sempre estiveram ao meu lado e sempre acreditaram que mesmo diante de tantas dificuldades eu conseguiria. Gratidão por tudo o que sempre fizeram por mim e pela nossa família!*

*Às minhas irmãs, Viviani e Juliana, por colocarem em prática o significado da palavra irmãs. Muito obrigada por me confortarem nas horas difíceis e por vibrarem a cada pequena conquista. Eu gostaria de ser pelo menos um pouquinho do que vocês imaginam que eu sou. Admiro muito a garra e esforço de vocês e tenho certeza que ainda dividiremos muitas conquistas.*

*Ao meu noivo Juan, que desde que entrou na minha vida nunca mediu esforços para me fazer feliz. Mesmo quando estava a quilômetros de distância se fazia presente e sempre dava um jeitinho de me surpreender. Só tenho a agradecer pela sua generosidade, por todo o sacrifício para estar ao meu lado e me agradar, pela sua paciência (e haja paciência), atenção e amor. Obrigada por tudo o que fez e faz por mim e pelos nossos filhotes, Frederico e Chicó.*

*À minha vizinha Tonha, por ser essa mulher incrível, que mesmo diante de todas as dificuldades impostas pela vida, nunca esmorece e sempre se mantém com um sorriso no rosto. A minha admiração por você só cresce a cada dia. Muito obrigada por todo amor e cuidados dispensados a mim. Que bom seria se eu tivesse metade da sua energia e disposição.*

*À minha orientadora, Profa. Dra. Wilma De Grava Kempinas, pela oportunidade de trabalhar com o que realmente gosto e acima de tudo pela confiança depositada em mim desde o início. Foram muitas as dificuldades encontradas nesses 4 anos e, mesmo nas situações mais difíceis e de desespero, quando realmente me via sem saída, a senhora esteve ao meu lado, segurando a minha mão, me aconselhando, incentivando e movendo céus e*



*terras para que o projeto saísse do papel. O tempo que trabalhamos juntas foi essencial para o meu crescimento pessoal e profissional. Foi uma grande honra concretizar esse trabalho sob a sua orientação.*

*Ao Dr. Gary Klinefelter, por toda assistência científica e anticorpos utilizados na localização e quantificação da proteína SP22. Muito obrigada por ter aceitado me receber no seu laboratório e por todo o conhecimento compartilhado. Apesar do pouco tempo, foi uma experiência fantástica, que contribuiu muito para o meu crescimento profissional. Me sinto honrada pela oportunidade de o ter conhecido pessoalmente e por fazer parte, mesmo que pequena, da Saga da SP22.*

*À Lillian Strader, que mesmo sem me conhecer foi muito atenciosa e carinhosa. A sua amabilidade e disponibilidade em ajudar fizeram toda a diferença durante a minha breve passagem pelo laboratório.*

*Ao Dr. Juan Suarez, por todo o comprometimento com as minhas análises e pela gentileza em me ensinar as técnicas do laboratório. Muito obrigada pela paciência e esforço para me compreender o que, às vezes, geraram boas risadas.*

*Ao Ramão e ao Jorge, quanto constrangimento hein? A compreensão e a disposição que tiveram para me ajudar são impagáveis. Ramão, muito obrigada pelas risadas, amizade e pelos cálculos de diversas soluções que você não ensinou direito, pois continuo sem saber fazer (hahahahaha). Jorge, minha eterna gratidão pelo apoio e palavras de incentivo. Ahh, não leve tão a sério as minhas sobrancelhas.*

*À Marília, minha grande amiga, que me reconhece somente pelo olhar e parece pressentir quando algo não está bem. Só posso agradecer pela sua amizade, cumplicidade e por sempre se fazer presente mesmo não existindo mais um convívio diário.*

*À Thamiris, uma pessoa incrível que tive a oportunidade conhecer durante o Doutorado e que se tornou uma grande amiga. Muito obrigada por ter doado o seu tempo para me auxiliar e por ter sido o meu ponto de apoio durante toda a execução deste trabalho. Você contribuiu para que os momentos mais difíceis se tornassem mais amenos e alegres. Acredite, você é uma pessoa encantadora, dedicada e divertida e me surpreende o fato de você não conseguir enxergar tamanha beleza e qualidades que existem em você.*

*À Cibele, sempre disposta a ajudar independente da hora. Muito obrigada por sempre me tranquilizar e fazer com que as adversidades não pareçam tão difíceis de serem solucionadas. Admiro muito a sua determinação e dedicação.*

*À todos os integrantes do ReproTox, por todo apoio, auxílio, comidinhas e momentos de descontração no laboratório.*

*À Profa. Dra. Fabiana Ferreira de Souza, pela doçura e maneira carinhosa que sempre me atendeu. Só tenho a agradecer por todo o tempo dedicado a mim no início das padronizações das técnicas.*

*À Dra. Camila Freitas Dell'Aqua, pela padronização das análises seminais funcionais pela técnica de citometria de fluxo. Muito obrigada pela contribuição e gentileza em compartilhar o seu conhecimento. Sem a sua ajuda uma parte desse trabalho não poderia ter sido realizada.*

*À Dra. Ana Gabriela Pontes Santos, por ter permitido as coletas no Centro de Reprodução Humana e à Dra. Gisela Alessandra Daroz, pelas análises seminais convencionais e pela torcida para que os pacientes pudessem integrar o estudo.*

*Ao Prof. Dr. Ramon Kaneno, Caru, Lari e Jofer pelo auxílio com as análises seminais funcionais pela técnica de citometria de fluxo.*

*Ao Prof. Dr. Frederico Ozanam Papa, Prof. Dr. Cláudio de Oliveira, Prof. Dr. Fausto Foresti e Prof. Dr. Luis Fernando Barbisan, pelos equipamentos cedidos para algumas das análises.*

*Ao José Eduardo Bozano, sempre alegre e com piadas e histórias para contar. Muito obrigada por sempre estar disposto a ajudar.*

*Ao Hélio Kushima, pelo auxílio na quantificação das proteínas totais de membrana. Muito obrigada pela atenção e por toda ajuda.*

*Ao Laboratório Biotest, especialmente a Eliane, Adriana e Aline, que sempre foram muito solícitas, atenciosas e gentis.*

*À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (Processo 2015/13941-3) por ter concedido a bolsa de estudo o que permitiu o desenvolvimento dessa Pesquisa e a minha dedicação total ao Doutorado.*

*Ao Programa de Pós-Graduação e seus funcionários, especialmente o Davi, pela ajuda em diversos momentos, atenção e disponibilidade.*

*Aos voluntários, parte fundamental desta pesquisa. Sem vocês nada disso seria possível! Obrigada por suas contribuições à ciência.*

*À todos meu carinho e mais profunda gratidão!!!*

*“Agradecer é admitir que houve um momento em que se precisou de alguém;  
É reconhecer que o homem jamais poderá lograr para si o dom de ser  
auto-suficiente. Ninguém e nada cresce sozinho; sempre é  
preciso um olhar de apoio, uma palavra de incentivo,  
um gesto de compreensão, uma atitude de amor.”*

*(Autor desconhecido)*

*Sonhar é verbo: é seguir, é pensar, inspirar e fazer força, insistir, é lutar, transpirar.  
São mil verbos que vem antes do verbo realizar.  
(Bráulio Bessa)*

## SUMÁRIO

<b>Resumo</b> .....	<b>1</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>3</b>
<b>Introdução</b> .....	<b>5</b>
Infertilidade Masculina .....	6
Testículo e Espermatogênese .....	9
Epidídimo e Maturação Espermática .....	18
Ejaculação .....	23
Jornada do Espermatozoide e Capacitação Espermática .....	24
O Processo de Fertilização .....	27
Proteômica e Biomarcadores de Fertilidade .....	29
Proteína Espermática SP22 .....	30
<b>Justificativa e Objetivos</b> .....	<b>35</b>
<b>Material e Métodos</b> .....	<b>37</b>
Grupo de Estudo .....	38
Coleta e Avaliação das Amostras .....	39
Amostras Seminais .....	39
Análises Seminais Convencionais .....	39
Seleção dos Espermatozoides .....	39
Padronização das Análises Seminais Funcionais por Citometria de Fluxo .....	39
Padronização dos Protocolos Multiparamétricos .....	40
Citômetro Equipado com laser Azul, Vermelho e Violeta .....	40
Citômetro Equipado com laser Azul e Vermelho .....	43
Análises Seminais Funcionais por Citometria de Fluxo .....	44
Análises da Proteína Espermática SP22 .....	44
Extração das Proteínas de Membrana .....	44
Dessalinização, Concentração e Ensaio de Proteínas .....	45
Quantificação da Proteína Espermática SP22 pelo Método de ELISA .....	45
Imunolocalização da Proteína Espermática SP22 .....	46
Amostras Sanguíneas .....	46
Análise Estatística .....	46

<b>Resultados</b> .....	<b>48</b>
Padronização das Análises Seminais Funcionais por Citometria de Fluxo .....	49
Citômetro Equipado com Laser Azul, Vermelho e Violeta .....	49
Citômetro Equipado com Laser Azul e Vermelho .....	50
Voluntários .....	51
Idade, Tempo de Infertilidade e Fecundidade .....	51
Análises Seminais Convencionais .....	52
Análises Seminais Funcionais .....	56
Análises da Proteína Espermática SP22 .....	58
Quantificação da Proteína Espermática SP22 pelo Método de ELISA .....	58
Imunolocalização da Proteína Espermática SP22 .....	60
Dosagens Hormonais .....	60
Pacientes Atendidos Pelo Centro de Reprodução .....	62
<b>Discussão</b> .....	<b>63</b>
<b>Conclusões</b> .....	<b>68</b>
<b>Referências Bibliográficas</b> .....	<b>70</b>
<b>Comitê de Ética</b> .....	<b>83</b>
<b>Termo de Consentimento</b> .....	<b>89</b>
<b>Anamnese</b> .....	<b>92</b>
<b>Apêndices</b> .....	<b>94</b>

*Resumo*

A infertilidade afeta aproximadamente 15% dos casais em idade reprodutiva, sendo o homem responsável por cerca da metade dos casos. A avaliação da fertilidade masculina é baseada em análises de parâmetros seminais clássicos e o advento de ensaios mais sofisticados aflora a esperança de identificar biomarcadores de fertilidade. A proteína espermática SP22 (*sperm protein*, 22kDa) tem demonstrado ser um biomarcador de fertilidade masculina, visto que, em ratos, está bem estabelecido que sua concentração, em extratos de espermatozoides da cauda epididimária, se correlaciona com a fertilidade desses gametas. No entanto, para incorporar essa proteína como um biomarcador em estudos epidemiológicos e clínicos são necessários dados quantitativos em humanos. Assim, o presente estudo teve por objetivos padronizar a técnica de quantificação e imunolocalização da proteína espermática SP22, investigar possíveis correlações entre parâmetros seminais convencionais e funcionais, de homens férteis e inférteis, com a concentração dessa proteína e avaliar o seu potencial preditivo como um biomarcador, não invasivo, de fertilidade. Para tanto foram realizados dois estudos observacionais: um do tipo caso-controle e outro do tipo seccional. O estudo caso-controle foi desenvolvido em amostras seminais de 44 voluntários da cidade de Botucatu e região, com idade entre 20 a 50 anos, que foram agrupados de acordo com a fertilidade: férteis (um ou mais filhos) e inférteis. Já o estudo seccional foi conduzido em amostras seminais de 12 pacientes inférteis atendidos pelo Centro de Reprodução Humana do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP, também com idade entre 20 a 50 anos. Em ambos os estudos foram excluídos aqueles casais cujo fator feminino de infertilidade estava presente. Foram realizadas padronização de protocolos multiparamétricos para a avaliação funcional dos espermatozoides pela técnica de citometria de fluxo, análises seminais convencionais e funcionais, quantificação e imunolocalização da proteína espermática SP22. A correlação entre alguns parâmetros foi investigada. Este estudo recebeu aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP e os indivíduos incluídos forneceram consentimento por escrito. Os voluntários inférteis exibiram redução no volume e no número total de espermatozoides do ejaculado bem como no volume, concentração espermática e número total de espermatozoides pós *swim-up*. Tanto os voluntários inférteis como os pacientes inférteis apresentaram porcentagem menor de células com morfologia normal. A motilidade progressiva rápida foi outro parâmetro de qualidade seminal que se mostrou reduzida nos pacientes inférteis. Além das alterações em alguns parâmetros seminais, os voluntários inférteis também exibiram redução na concentração sérica do LH. As análises dos coeficientes de determinação indicaram que os protocolos multiparamétricos propostos são adequados. Apesar de não terem sido observadas diferenças significativas entre os grupos com relação aos parâmetros seminais funcionais, os danos na membrana plasmática foram positivamente correlacionados com a produção de ânion superóxido na matriz mitocondrial. A imunolocalização revelou que a SP22 está presente, dentre outros locais, no segmento equatorial da cabeça do espermatozoide. A análise da concentração dessa proteína, realizada até o momento, não foi significativamente diferente entre os voluntários férteis e inférteis bem como não foi correlacionada com nenhum dos parâmetros investigados. Portanto, a avaliação das amostras seminais remanescentes, inclusive utilizando anticorpos monoclonais altamente purificados por afinidade, que se encontra em andamento, será fundamental para complementar o presente estudo. De qualquer forma, este é um passo inicial importante no sentido de caracterizar a SP22 como um potencial biomarcador não invasivo preditivo de fertilidade/infertilidade em humanos, podendo vir a subsidiar estudos epidemiológicos e clínicos.

**Palavras chave:** análises seminais convencionais, análises seminais funcionais, espermatozoide humano, citometria de fluxo, biomarcador de fertilidade, SP22.



*Abstract*

Infertility affects approximately 15% of couples in reproductive age and 50% of the cases are directly related to man. The evaluation of male fertility is based on analyses of classical seminal parameters and the advent of more sophisticated assays outcrop the hope of to identify fertility biomarkers. Sperm protein SP22 (22kDa) has been shown to be a male fertility biomarker since, in rats, it is well established that its concentration, in sperm extractions from the epididymal tail, correlates with the fertility of these gametes. However, to incorporate this protein as a fertility biomarker in epidemiological and clinical studies, quantitative data are required in humans. Thus, the present study aimed to standardize the SP22 quantification and immunolocalization technique, investigate possible correlations among conventional and functional seminal parameters of fertile and infertile men with the concentration of this protein and to evaluate its predictive potential as a non-invasive fertility biomarker. Therefore, two observational studies were performed: one case-control type and the other sectional type. The case-control study was carried out on 44 volunteers's seminal samples from Botucatu city and region, aged between 20 and 50 years, who were placed according to fertility: fertile (one or more children) and infertile. The sectional study was carried out on 12 patients's attendend by the Human Reproduction Center of the Botucatu Medical School – UNESP, also aged between 20 and 50 years. In both studies were excluded those couples whose female factor of infertility was present. Multiparametric protocols standardization for the spermatozoa functional evaluation by flow cytometry technique, conventional and functional seminal analyzes, quantification and immunolocalization of SP22 were performed. The correlation among some parameters were investigated. This study was approved by Research Ethics Committee of the Botucatu Medical School – UNESP and the individuals included provided written consent. Infertile volunteers exhibited a reduction in volume and total sperm number of ejaculated as well as in volume, sperm concentration and total sperm number of post-swim-up. Both infertile volunteers and infertile patients had a lower percentage of cells with normal morphology. Fast progressive motility was another seminal quality parameter that was shown to be reduced in infertile patients. In addition to changes in some seminal parameters, infertile volunteers also exhibit a reduction in serum concentration of LH. The analyzes of the determination coefficients indicated that the proposed multiparametric protocols are adequate. Although no significant differences were observed between groups regarding functional seminal parameters, damage plasma membrane was positively correlated with superoxide anion production in the mitochondrial matrix. Immunostaining revealed the presence of SP22, among other sites, in the equatorial segment of the sperm head. The concentration determination of SP22, performed to date, was not significantly different between fertile and infertile volunteers and was not correlated with any of the parameters investigated. Therefore, the evaluation of the remaining seminal samples, using affinity purified monoclonal antibodies, which is underway, will be fundamental to complement the present study. However, this is an important intial step in the characterizing of SP22 as a potential non-invasive biomarker predicitive of fertility/infertility in humans that may support epidemiological and clinical studies.

**Keywords:** Conventional seminal analyzes, functional seminal analyzes, human spermatozoa, flow cytometry, fertility biomarker, SP22.

# *Introdução*

## INFERTILIDADE MASCULINA

O desejo de ter filhos é inegavelmente uma das metas mais almejadas na vida adulta da maioria das pessoas, contudo, nem todo casal que deseja engravidar irá conseguir espontaneamente sem ajuda médica (Boivin *et al.*, 2007), o que provoca impacto no bem-estar desses indivíduos (Babore *et al.*, 2017). O casal diagnosticado com infertilidade manifesta uma variedade de sentimentos como depressão, ansiedade, angústia, frustração, isolamento e baixa autoestima (Wright *et al.*, 1991; Greil, 1997).

A infertilidade, classicamente definida como a incapacidade de conceber após 12 meses de relações sexuais regulares e desprotegidas, é um revés mundial cada vez mais prevalente que afeta aproximadamente 15% dos casais em idade reprodutiva (Zegers-Hochschild, 2009; World Health Organization, 2010). Embora a infertilidade ainda seja vista primariamente como um problema feminino (Fidler & Bernstein, 1999; Kolletis, 2003), suas causas também são atribuídas a fatores masculinos, mistos e idiopático. Uma vez que é difícil designar a participação exata de cada um desses fatores, geralmente, o Comitê de Prática da Sociedade Americana de Medicina Reprodutiva - *Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine* (2015) relata que 50% dos casos são atribuídos a fatores masculinos, sendo que estes atuam como único contribuinte em 20% das infertilidades e em 30% em conjunto com fatores femininos. A causa específica da infertilidade masculina não pode ser determinada em uma proporção de 40 a 50% dos casos (Kretser & Baker, 1999), pois cada indivíduo contribui com complexo conjunto de diferenças genéticas, proteômicas e metabólicas que interagem de maneira imprevisível (Kovac *et al.*, 2013).

A diminuição da fertilidade masculina pode estar relacionada a uma variedade de fatores congênitos ou adquiridos que atuam a nível pré-testicular, testicular ou pós-testicular. As causas pré-testiculares incluem principalmente os distúrbios endócrinos e do coito, já as testiculares abrangem os distúrbios genéticos, doenças infecciosas e sistêmicas e traumas testiculares, enquanto as pós-testiculares compreendem as lesões obstrutivas/subobstrutivas, doenças infecciosas e inflamatórias das glândulas sexuais acessórias e produção de anticorpos antiespermatozoides (Kraus, 2011; Chowdhary & Tiwari, 2016).

A avaliação da infertilidade masculina é realizada com o intuito de que o histórico detalhado, exame físico, análise seminal e hormonal forneçam informações relevantes (Turek, 2005; Shefi & Turek, 2006) que ajudem a identificar possíveis etiologias que possam estar associadas à redução do potencial fértil (Kraus *et al.*, 2011). Um histórico sexual detalhado

esclarece diversas questões como a duração da infertilidade, tempo e frequência das relações sexuais, se o casal vivencia infertilidade primária ou secundária e se um dos parceiros já concebeu anteriormente. Bem como, elucida sobre a presença de qualquer distúrbio sexual como disfunção erétil e ejaculação precoce (Brugh & Lipshultz, 2004; Choy & Ellsworth, 2012). Já o histórico médico indica se prévias cirurgias prostática, inguinal, escrotal, pélvica ou retroperitoneal podem ter afetado a emissão ou ejaculação (Choy & Ellsworth, 2012), o que resulta na deposição inadequada dos espermatozoides na vagina (Brugh & Lipshultz, 2004). Relatos de cânceres, particularmente o testicular, e de terapias como quimioterapia e radioterapia também são relevantes e devem ser investigados (Choy & Ellsworth, 2012), visto que são reconhecidos por seus potenciais efeitos adversos na produção dos espermatozoides (Brugh *et al.*, 2003). Finalmente, o histórico social fornece informações sobre quaisquer fatores adicionais de risco para a fertilidade como abuso de álcool, utilização de tabaco e esteroides anabolizantes, exposição a tóxicos ambientais, medicamentos gonadotóxicos e a fontes de calor como saunas e banheiras de hidromassagem (Brugh & Lipshultz, 2004; Choy & Ellsworth, 2012) e estresse crônico (Walczak-Jedrzejowska *et al.*, 2013).

Já a avaliação física visa identificar desequilíbrios hormonais que possam perturbar a virilização, bem como, detectar patologias peniana e escrotal. Durante o exame geniturinário, os testículos são cuidadosamente examinados quanto à varicocele, seu volume é mensurado, dado que a diminuição da massa testicular é indicativa de comprometimento da espermatogênese e os cordões espermáticos palpados para descartar a ausência congênita bilateral dos ductos deferentes (Brugh & Lipshultz, 2004; Choy & Ellsworth, 2012). Por fim, o exame retal pondera sobre o tônus esfínteriano, tamanho e consistência da próstata e presença de cistos e de vesículas seminais aumentadas (Choy & Ellsworth, 2012).

A análise do sêmen, procedimento de rotina na investigação da infertilidade, fornece informações descritivas sobre o volume seminal, número total de espermatozoides, concentração, motilidade, morfologia e vitalidade espermáticas (Aitken, 2006). Tais análises são realizadas de acordo com procedimentos preconizados pela Organização Mundial da Saúde – *World Health Organization* (WHO) (2010) que sugere uma série de valores limiares considerados normais para o sêmen humano (Tabela 1), assim como, a nomenclatura para condições normal e patológica (Tabela 2).

**Tabela 1.** Valores mínimos de referência para parâmetros seminais convencionais.

<b>Parâmetro Seminal</b>	<b>Valores de Referência</b>
Liquefação	< 60 min.
Volume	≥ 1,5 (mL)
pH	≥ 7,2
Concentração espermática	≥ 15 (10 <sup>6</sup> /mL)
Número total de espermatozoides	≥ 39 (10 <sup>6</sup> /ejaculado)
Motilidade espermática total	≥ 40% (≥ 15,6×10 <sup>6</sup> /ejaculado)
Motilidade espermática progressiva	≥ 32% (≥ 12,5×10 <sup>6</sup> /ejaculado)
Morfologia espermática normal	≥ 4% (≥ 1,6×10 <sup>6</sup> /ejaculado)
Vitalidade	58% (≥ 22,6×10 <sup>6</sup> /ejaculado)

Fonte: Adaptado de WHO, 2010.

**Tabela 2.** Nomenclatura relacionada à qualidade seminal.

<b>Nomenclatura</b>	<b>Definição</b>
Normozoospermia	Ejaculado normal
Aspermia	Ausência de ejaculado
Hipospermia	Volume ejaculado abaixo do limite de referência
Azoospermia	Ausência de espermatozoides no ejaculado
Oligozoospermia	Concentração ou número total de espermatozoides abaixo do limite de referência
Astenozoospermia	Motilidade progressiva abaixo do limite de referência
Teratozoospermia	Morfologia normal abaixo do limite de referência
Oligoastenozoospermia	Concentração ou número total de espermatozoides e motilidade progressiva abaixo do limite de referência
Oligoteratozoospermia	Concentração ou número total de espermatozoides e morfologia normal abaixo do limite de referência
Oligoastenoteratozoospermia	Concentração ou número total de espermatozoides, motilidade progressiva e morfologia normal abaixo do limite de referência
Astenoteratozoospermia	Motilidade progressiva e morfologia normal abaixo do limite de referência
Necrozoospermia	Porcentagem de espermatozoides vivos abaixo do limite de referência
Leucocitospermia (piospermia)	Alta concentração de leucócitos no ejaculado
Hematospermia	Alta concentração de eritrócitos no ejaculado

Fonte: Adaptado de WHO, 2010.

A avaliação hormonal pode fornecer pistas importantes sobre a etiologia da infertilidade, visto que o hormônio folículo estimulante – *follicle stimulating hormone* (FSH), hormônio luteinizante – *luteinizing hormone* (LH) e a testosterona desempenham papel vital no início e na manutenção da função reprodutiva bem como propiciam uma visão geral do eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal (Meeker *et al.*, 2007). Tanto concentrações elevadas quanto diminuídas desses hormônios são responsáveis por alterações na produção dos espermatozoides. Como exemplos, a concentração sérica elevada do FSH, geralmente, é indicativa de espermatogênese prejudicada (Choy & Ellsworth, 2012) e está relacionada à azoospermia e oligozoospermia grave (Bergmann *et al.*, 1994) e concentrações reduzidas do FSH, LH e testosterona são sinais de insuficiência testicular completa designada de hipogonadismo hipogonadotrófico (Choy & Ellsworth, 2012).

O processo de produção dos espermatozoides é muito sensível à saúde geral do corpo e os problemas que fazem com que o corpo adoça frequentemente afetam essa produção (Shefi & Turek, 2006), que também pode ser comprometida por uma variedade de razões genéticas e epigenéticas (Aitken, 2018). Portanto, compreender esse processo é fundamental para decidir se a deficiência no número ou qualidade dos espermatozoides ejaculados, ou ambos, contribuem para a dificuldade de um casal iniciar uma gravidez (Amann, 2008).

## **TESTÍCULO E ESPERMATOGÊNESE**

O testículo humano é um órgão de forma elipsoide, com diâmetro de 2,5 x 4 cm, envolvido por uma cápsula de tecido conectivo denso, a túnica albugínea (Holstein *et al.*, 2003; Sharma, 2007). Septos delgados dessa túnica, denominados de séptulos testiculares, dividem o parênquima do testículo em aproximadamente 250 a 300 lóbulos cônicos. Esses lóbulos, altamente organizados e complexos, são compostos por túbulos seminíferos e tecido intersticial (Holstein *et al.*, 2003; Sharma, 2007; Weinbauer *et al.*, 2010; Neto *et al.*, 2016; O'Donnell *et al.*, 2017), que embora anatomicamente separados estão intimamente conectados (Figura 1) (Weinbauer *et al.*, 2010).

*Conclusões*



Os resultados obtidos demonstraram que a qualidade espermática tanto dos voluntários inférteis como dos pacientes inférteis se encontram comprometidas. Além disso, o status hormonal dos voluntários inférteis também apresentou alterações. A partir do coeficiente de determinação foi possível constatar que os protocolos multiparamétricos propostos para as análises funcionais dos espermatozoides pela técnica de citometria de fluxo, seja para o citômetro equipado com 3 ou 2 lasers, são adequados. Apesar de não terem sido observadas diferenças nos parâmetros funcionais, os danos na membrana plasmática exibiu correlação positiva com a produção de ânion superóxido na matriz mitocondrial. Através das análises realizadas até o momento não foram verificadas diferenças estatisticamente significantes entre os voluntários férteis e inférteis quanto à concentração da proteína de membrana espermática SP22, bem como a sua concentração não foi correlacionada com nenhum dos parâmetros investigados. Essa proteína foi localizada, dentre outros locais, no segmento equatorial da cabeça do espermatozoide, revelando sua importância no processo de fertilização. A finalização das análises, inclusive utilizando anticorpos monoclonais altamente purificados por afinidade, que se encontra em andamento, será fundamental para complementar o presente estudo. De qualquer forma, este é um passo inicial e visa abrir novos caminhos na caracterização da SP22 como um potencial biomarcador não invasivo preditivo de fertilidade/infertilidade em homens, podendo subsidiar estudos epidemiológicos e clínicos.

*Referências  
Bibliográficas*

- Abou-Haila, A.; Tulsiani, D. R. P. Mammalian sperm acrosome: formation, contents, and function. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v.379, p.173-182, 2000.
- Agarwal, A.; Virk, G.; Ong, C.; Plessis, S. S. Effect of oxidative stress on male reproduction. *The World Journal of Men's Health*, v.32, p.1-17, 2014.
- Aitken, R. J. Human spermatozoa: revelations on the road to conception. *F1000Prime Reports*, v.5, p.1-9, 2013.
- Aitken, R. J. Not every sperm is sacred; a perspective on male infertility. *Molecular Human Reproduction*, v.24, p.287-298, 2018.
- Aitken, R. J. Sperm function tests and fertility. *International Journal of Andrology*, v.29, p.69-75, 2006.
- Aitken, R. J.; Nixon, B. Sperm capacitation: a distant landscape glimpsed but unexplored. *Molecular Human reproduction*, v.19, p.785-793, 2013.
- Aitken, R. J.; Sutton, M.; Warner, P.; Richardson, D. W. Relationship between the movement characteristics of human spermatozoa and their ability to penetrate cervical mucus and zona-free hamster oocytes. *Journal of Reproduction and Fertility*, v.73, p.441-449, 1985.
- Alwaal, A.; Breyer, B. N.; Lue, T. F. Normal male sexual function: emphasis on orgasm and ejaculation. *Fertility and Sterility*, v.104, p.1051-1060, 2015.
- Amann, R. P. Evaluating spermatogenesis using sêmen: the biology of emission tells why reproting total sperm per sample is importante, and why reporting only number of sperm per milliliter is irrational. *Journal of Andrology*, v.30, p.623-625, 2009.
- Amann, R. P. The cycle of the seminiferous epithelium in humans: a need to revisit?. *Journal of Andrology*, v.29, p.469-487, 2008.
- Amaral, A.; castillo, J.; Ramalho-Santos, J.; Oliva, R. The combined human sperm proteome: cellular pathways and implications for basic and clinical science. *Human Reproduction Update*, v.20, p.40-62, 2014.
- Arrotéia, K. F.; Garcia, P. V.; Barbieri, M. F.; Justino, M. L.; Pereira, L. A. V. The epididymis: embryology, structure, function and its role in fertilization and infertility. In: Pereira, L. A. V., editor. *Embryology – Updates and Highlights on Classic Topics*. 1<sup>st</sup> ed., Rijeka: InTech, 2012, p.41-67.
- Auger, J. Assessing human sperm morphology: top models, underdogs or biometrics? *Asian Journal of Andrology*, v. 12, p.36-46, 2010.
- Babore, A.; Stuppia, L.; Trumello, C.; Candelori, C.; Antonucci, I. Male fator infertility and lack of openness about infertility as risk factors for depressive symptoms in males undergoing assisted reproductive technology treatment in Italy. *Fertility and Sterility*, v.107, p.1041-1047, 2017.

- Baldi, E.; Luconi, M.; Bonaccorsi, L.; Muratori, M.; Forti, G. Intracellular events and signaling pathways involved in sperm acquisition of fertilizing capacity and acrosome reaction. *Frontiers in Bioscience*, v.5 p.e110-e123, 2000.
- Barazani, Y.; Agarwal, A.; Sabanegh, E. S. Jr. Functional sperm testing and the role of proteomics in the evaluation of male infertility, *Urology*, v.84, p.255-261, 2014.
- Barroso, G.; Alvarez, A.; Valdespin, C. Sperm flow cytometry: beyond human fertilization and embryo development. In: Schmid, I., editor. *Flow Cytometry Select Topics*. 1<sup>st</sup> ed., InTechOpen, 2016, p1-12.
- Bergmann, M.; Behre, H. M.; Nieschlag, E. Serum FSH and testicular morphology in male infertility. *Clinical Endocrinology*, v.40, p.133-136, 1994.
- Boivin, J.; Bunting, L.; Collins, J. A.; Nygren, K. G. International estimates of infertility prevalence and treatment-seeking: potential need and demand for infertility medical care. *Human Reproduction*, v.22, p.1506-1512, 2007.
- Bonifati, V.; Rizzu, P.; van Baren, M. J.; Schaap, O.; Breedveld, G. J.; Krieger, E.; Dekker, M. C.; Squitieri, F.; Ibanez, P.; Joosse, M.; van Dongen, J. W.; Vanacore, N.; van Swieten, J. C.; Brice, A.; Meco, G.; van Duijn, C. M.; Oostra, B. A.; Heutink, P. Mutations in the DJ-1 gene associated with autosomal recessive early-onset parkinsonism. *Science*, v.299, p.256-259, 2003.
- Boue, F.; Blais, J.; Sullivan, R. Surface localization of P34H, an epididymal protein, during maturation, capacitation, and acrosome reaction of human spermatozoa. *Biology of Reproduction*, v.54, p.1009-1017, 1996.
- Bracke, A.; Peeters, K.; Punjabi, U.; Hoogewijs, D.; Dewilde, S. A search for molecular mechanisms underlying male idiopathic infertility. *Reproductive Biomedicine Online*, v.36, p.327-339, 2018.
- Brewis, I. A.; Gadella, B. M. Sperm surface proteomics: from protein lists to biological function. *Molecular Human Reproduction*, v.16, p.68-79, 2010.
- Brooks, D. E.; Means, A. R.; Wright, E. J.; Singh, S. P.; Tiver, K. K. Molecular cloning of the cDNA for androgen-dependent sperm-coating glycoproteins secreted by the rat epididymis. *European Journal of Biochemistry*, v.161, p.13-18, 1986.
- Brugh, V. M.; Lipshultz, L. I. Male factor infertility evaluation and management. *Medical Clinics of North America*, v.88, p.367-385, 2004.
- Brugh, V. M.; Matschke, M.; Lipshultz, L. I. Male factor infertility. *Endocrinology & Metabolism Clinics of North America*, v.32, p.689-707, 2003.
- Cheng, C. Y.; Mruk, D. D. A local autocrine axis in the testes that regulates spermatogenesis. *Nature Reviews Endocrinology*, v.6, p.380-395, 2010.
- Cheng, C. Y.; Wong, E. W. P.; Lie, P. P. Y.; Li, M. W. M.; Mruk, D. D.; Yan, H. H. N.; Mok, Ka-Wai; Mannu, J.; Mathur, P. P.; Lui, Wing-Yee; Lee, W. M.; Bonanomi, M.; Silvestrini,

- B. Regulation of blood-testis barrier dynamics by desmosome, gap junction, hemidesmosome and polarity proteins. *Spermatogenesis*, v.1, p.105-115, 2011.
- Cheng, C. Y.; Mruk, D. D. Cell junction dynamics in the testis: Sertoli-germ cell interactions and male contraceptive development. *Physiological Reviews*, v.82, p.825-874, 2002.
- Chowdhary, R.; Tiwari, B. Understanding male infertility and its causes: a review. *International Journal of Biomedicine Research*, v.7, p.702-707, 2016.
- Choy, J. T.; Ellsworth, P. Overview of current approaches to the evaluation and management of male infertility. *Urologic Nursing*, v.32, p.286-295, 2012.
- Clement, P.; Giuliano, F. Physiology and pharmacology of ejaculation. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, v. 119, p.18-25, 2016.
- Clermont, Y. The cycle of the seminiferous epithelium in man. *The American Journal of Anatomy*, v.112, p.36-51, 1963.
- Cohen, D. J.; Maldera, J. A.; Vasen, G.; Ernesto, J. I.; Muñoz, M. W.; Battistone, M. A.; Cuasnicú, P. S. Epididymal protein CRISP1 plays different roles during the fertilization process. *Journal of Andrology*, v.32, p.672-678, 2011.
- Cooper, T. G.; Yeung, C. H. Physiology of sperm maturation and fertilization. In: Nieschlag, E.; Behre, H. M.; Nieschlag, S., editors. *Andrology: Male Reproductive Health and Dysfunction*. 3<sup>rd</sup> ed., New York: Springer, 2010, p.61-86.
- Cooper, T. G.; Yeung, C-H. Sperm maturation in the human epididymis. In: Jonge, C. J.; Barratt, C., editors. *The sperm cell: production, maturation, fertilization, regeneration*. 1<sup>st</sup> ed., Cambridge: Cambridge University Press, 2006, p.72-107.
- Cordelli, E.; Eleuteri, P.; Leter, G.; Rescia, M.; Spanò, M. Flow cytometry applications in the evaluation of sperm quality: semen analysis, sperm function and DNA integrity. *Contraception*, v.72, p.273-279, 2005.
- Cornwall, G. A.; von Horsten, H. H. Sperm maturation in the epididymis. In: Carrel, D. T., editor. *The Genetics of Male Infertility*. 1<sup>st</sup> ed., New Jersey: Humana Press, 2007, p.211-231.
- Croxatto, H. Physiology of gamete and embryo transport through the Fallopian tube. *Reproductive BioMedicine*, v.4, p.160-169, 2002.
- Cuasnicú, P. S.; Cohen, D. J.; Ellerman, D. A.; Busso, D.; Ros, V. G.; Morgenfeld, M. M. Changes in specific sperm proteins during epididymal maturation. In: Robaire, B. & Hinton, B. T, editors. *The epididymis from molecules to clinical practice. A comprehensive survey of the efferent ducts, the epididymis and the vas deferens*. 2<sup>nd</sup> ed., New York: Springer Science, 2002, p.389-403.
- Dacheux, J. L.; Belleannée, C.; Guyonnet, B.; Labas, V.; Gomes, A. P. T.; Ecroyd, H.; Druart, X.; Gatti, J. L.; Dacheux, F. The contribution of proteomics to understanding epididymal maturation of mammalian spermatozoa. *Systems Biology in Reproductive Medicine*, v.58, p.197-210, 2012.

- Dacheux, J. L.; Castella, S.; Gatti, J. L.; Dacheux, F. Epididymal cell secretory activities and the role of proteins in boar sperm maturation. *Theriogenology*, v.63, p.319-341, 2005.
- Dacheux, J. L.; Dacheux, F. New insights into epididimal function in relation to sperm maturation. *Reproduction*, v.147, p.R27-R42, 2014.
- Dacheux, J. L.; Gatti, J. L.; Dacheux, F. Contribution of epididimal secretory proteins for spermatozoa maturation. *Microscopy Research and Technique*, v.61, p.7-17, 2003.
- Daudin M., Bieth E., Bujan L., Massat G., Pontonnier F., Mieuxet R. Congenital bilateral absence of the vas deferens: clinical characteristics, biological parameters, cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene mutations, and implications for genetic counseling. *Fertility and Sterility*, v.74, p.1164-1174, 2000.
- de la Taille A., Rigot J. M., Mahe P., Gervais R., Dumur V., Lemaitre L., Mazeman E. Correlation of genitourinary abnormalities, spermogram and *CFTR* genotype in patients with bilateral agenesis of the vas deferens. *Progress in Urology*, v.8, p.370-376, 1998.
- du Plessis, S.; Kashou, A. H.; Benjamin, D. J.; Yadav, S. P.; Agarwal, A. Proteomics: a subcellular look at spermatozoa. *Reproductive Biology and Endocrinology*, v.9, p.2-12, 2011.
- Eisenbach, M.; Giojalas, L. C. Sperm guidance in mammals – an unpaved road to the egg. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, v.7, p.276-285, 2006.
- Ellerman, D. A.; Cohen, D. J.; DaRos, V. G.; Morgenfeld, M. M.; Busso, D.; Cuasnicu, P. S. Sperm protein DE mediates gamete fusion through an evolutionarily conserved site of the CRISP family. *Developmental Biology*, v.297, p.228-237, 2006.
- Favareto, A. P. A.; Rodello, L.; Taconeli, C. A.; Bicudo, S. D.; Klinefelter, G. R.; Kempinas, W. G. Identification of the SP22 sperm protein in Santa Inês and Doper Rams. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 45, p.323-330, 2010.
- Fawcett, D. W. Sperm flagellum. In: Fawcett, D. W., editor. *The Cell*. 2<sup>nd</sup> ed., Philadelphia, W.B. Saunders Company, 1997, p. 604-639.
- Fidler, A. T.; Bernstein, J. Infertility: from a personal public health. *Public Health Reports*, v.114, p. 494-511, 1999.
- Florman. H. M.; Fissori, R. A. Fertilization in mammals. In: Plant, T. M.; Zeleznik, A. J., editors. *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*. 4<sup>th</sup> ed., Academic Press, 2015, p.149-196.
- França, L. R.; Hess, R. A.; Dufour, J. M; Hofmann, M. C.; Griswold, M. D. The Sertoli cell: one hundred fifty years of beauty and plasticity. *Andrology*, v.4, p.189-212, 2016.
- Fraser, R.; Lin, C-J. Epigenetic reprogramming of the zygote in mice and men: on your marks, get set, go! *Reproduction*, v.152, p.R211-R222, 2016.

- Freitas-Dell'Aqua, C. P.; Guasti, P. N.; Monteiro, G. A.; Maziero, R. R. D.; Dell'Aqua Jr, J. A.; Papa, F. O. Flow cytometric analysis of fertile and subfertile frozen stallion spermatozoa. *Animal Reproduction*, v.9, p.941, 2012.
- Freitas-Dell'Aqua, C. P.; Guasti, P. N.; Papa, F. O.; Canisso, I. F.; Dell'Aqua Jr, J. A. Superoxide anion is reduced in gradient selected cryopreserved stallion semen despite high mitochondrial potential. *Journal of Veterinary Science*, v.66, p.57, 2018.
- García-Vázquez, F. A.; Gadea, J.; Matás, C.; Holt, W. V. Importance of sperm morphology during sperm transport and fertilization in mammals. *Asian Journal of Andrology*, v.18, p.844-850, 2016.
- Garrido, N.; Meseguer, M.; Remohi, J.; Pellicer, A.; Simón, C. Flow cytometry in human reproductive biology. *Gynecological Endocrinology*, v.16, p.505-521, 2002.
- Gassei, K.; Orwing, K. E. Experimental methods to preserve male fertility and treat male factor infertility. *Fertility and Sterility*, v.105, p.256-266, 2016.
- Gatti, J. L.; Castella, S.; Dacheux, F.; Ecroyd, H.; Métayer, S.; Thimon, V.; Dacheux, J. L. Post-testicular sperm environment and fertility. *Animal Reproduction Science*, v.82-83, p.321-339, 2004.
- Gaudreault, C.; Montfort, L.; Sullivan, R. Effect of immunization of hamsters against recombinant P26h on fertility rates. *Reproduction*, v.123, p.307-313, 2002.
- Gervasi, M. G.; Visconti, P. E. Molecular changes and signaling events occurring in sperm during epididymal maturation. *Andrology*, v.5, p.204-218, 2017.
- Gillan, L.; Evans, G.; Maxwell, W. M. C. Flow cytometry evaluation of sperm parameters in relation to fertility potential. *Theriogenology*, v.63, p.445-457, 2005.
- Giuliano, F.; Clement, P. Physiology of ejaculation: emphasis on serotonergic control. *European Urology*, v.48, p.408-417, 2005.
- Goldberg, E.; Shelton, J. A. Control of fertilization by immunization with peptide fragments of sperm specific LDH-C4. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, v.207, p.395-406, 1986.
- Greil, A. L. Infertility and psychological distress: a critical review of the literature. *Social Science & Medicine*, v.45, p.1679-1704, 1997.
- Hamil, K. G.; Sivashanmugam, P.; Richardson, R. T.; Grossman, G.; Ruben, S. M.; Mohler, J. L.; Petrusz, P.; O'Rand, M. G.; French, F. S.; Hall, S. H.; HE2beta and HE2gamma, new members of an epididymis-specific family of androgen-regulated proteins in the human. *Endocrinology*, v.141, p.1245-1253, 2000.
- Hammerstedt, R. H.; Cramer, P. G.; Barbato, G. F.; Amann, R. P.; O'Brien, J. S.; Griswold, M. D. A fragment of prosaposin (SGP-1) from rooster sperm promotes sperm-egg binding and improves fertility in chickens. *Journal of Andrology*, v.22, p.361-375, 2001.

- Han, L.; Taub, R.; Jensen, J. T. Cervical mucus and contraception: what we know and what we don't. *Contraception*, v.96, p.310-321, 2017.
- Hao, Z.; Wolkowicz, M. J.; Shetty, J.; Klotz, K.; Bolling, L.; Sem, B.; Westbrook, V. A.; Coonrod, S.; Flickinger, C. J.; Herr, J. C. SAMP, a testis-specific, isoantigenic sperm acrossomal membrane-associated protein. *Biology of Reproduction*, v.66, p.735-744, 2002.
- Hermo, L.; Robaire, B. Epididymal cell types and their functions. In: Robaire, B. & Hinton, B. T, editors. *The epididymis from molecules to clinical practice. A comprehensive survey of the efferent ducts, the epididymis and the vas deferens*. 2<sup>nd</sup> ed., New York: Springer Science, 2002, p.81-102.
- Herr, J. C.; Flickinger, C. J.; Homyk, M.; Klotz, K.; John, E. Biochemical and morphological characterization of the intra-acrosomal antigen SP-10 from human sperm. *Biology of Reproduction*, v.42, p.181-193, 1990.
- Hess, R. A. The efferent ductules: structure and functions. In: Robaire, B. & Hinton, B. T, editors. *The epididymis from molecules to clinical practice. A comprehensive survey of the efferent ducts, the epididymis and the vas deferens*. 2<sup>nd</sup> ed., New York: Springer Science, 2002, p.389-403.
- Hod, Y.; Pentylala, S. N.; Whyared, T. C.; El-Maghrabi, R. Identification and characterization of a novel protein that regulates RNA-protein interaction. *Journal Cell Biochemistry*, v.72, p.435-444, 1999.
- Holstein, A-F.; Schulze, W.; Davidoff, M. Understanding spermatogenesis is a prerequisite for treatment. *Reproductive Biology and Endocrinology*, v.1, p.1-16, 2003.
- Hossain, Md. S.; Johannisson, A.; Wallgren, M.; Nagy, S.; Siqueira, A. P.; Rodriguez-Martinez, H. Flow cytometry for the assessment of animal sperm integrity and functionality: state of the art. *Asian Journal of Andrology*, v.13, p.406-419, 2011.
- Ikawa, M.; Inoue, N.; Benham, A. M.; Okabe, M. Fertilization: a sperm's journey to and interaction with the oocyte. *The Journal of Clinical Investigation*, v.120, p.1-11, 2010.
- Inaba, K. Sperm flagella: comparative and phylogenetic perspectives of protein components. *Molecular Human Reproduction*, v.17, p.524-538, 2011.
- Jelinsky, S. A.; Turner, T. T.; Bang, H. J.; Finger, J. N.; Solarz, M. K.; Wilson, E.; Brown, E. L.; Kopf, G. S.; Johnston, D. S. The rat epididymal transcriptome: comparison of segmental gene expression in the rat and mouse epididymides. *Biology of Reproduction*, v.76, p.561-570, 2007.
- Kaydos, E. H.; Suarez, J. D.; Roberts, N. L.; Bobseine, K.; Zucker, R.; Laskey, J.; Klinefelter, G. R. Haloacid induced alterations in fertility and the sperm biomarker SP22 in the rat are additive: validation of an ELISA. *Toxicological Sciences*, v.81, p.430-442, 2004.
- Klinefelter, G. R. Saga of a sperm fertility biomarker. *Animal Reproduction Science*, v.105, p.90-103, 2008.



- Klinefelter, G. R.; Laskey, J. W.; Ferrell, J.; Suarez, J. D.; Roberts, N. L. Discriminant analysis indicates a single sperm protein (SP22) is predictive of fertility following exposure to epididymal toxicants. *Journal of Andrology*, v.18, p.139-150, 1997.
- Klinefelter, G. R.; Strader, L. F.; Suarez, J. D.; Roberts, N. L. Bromochloroacetic acid exerts qualitative effects on rat sperm: implications for a novel biomarker. *Toxicological sciences*, v.68, p.164-173, 2002(a).
- Klinefelter, G. R.; Welch, J. E. The saga of a male fertility protein (SP22). *Annual Review of Biomedical Sciences*, v.1, p.145-184, 1999.
- Klinefelter, G. R.; Welch, J. E.; Perreault, S. D.; Moore, H. D.; Zucker, R. M.; Suarez, J. D.; Roberts, N. L.; Bobseine, K.; Jeffay, S. Localization of the sperm protein SP22 and inhibition of fertility in vivo and in vitro. *Journal of Andrology*, v.23, p.48-63, 2002(b).
- Kolettis, P. N. Evaluation of the subfertile man. *American Family Physician*, v.67, p.2165-2172, 2003.
- Kovac, J. R.; Pastuszak, A. W.; Lamb, D. J. The use of genomics, proteomics, and metabolomics in identifying biomarkers of male infertility. *Fertility and Sterility*, v.99, p.998-1007, 2013.
- Kraus, C. Male infertility: pathogenesis and clinical diagnosis. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, v.25, p.271-285, 2011.
- Kretser, D. M.; Baker, H. W. G. Infertility in men: recente advances and continuing controversies. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, v.84, p.3443-3450, 1999.
- Kruger, T. F.; Menkveld, R.; Stander, F. S.; Lombard, C. J.; Van der Merwe, J. P.; Van Zyl, J. A.; Smith, K. Sperm morphologic features as a prognostic factor in vitro fertilization. *Fertility and Sterility*, v.46, p.1118-1123, 1986.
- Kumar, S.; Tomar, A. K.; Singh, S.; Saraswat, M.; Singh, S.; Singh, T. P.; Yadav, S. Human sérum albumin as a new interacting partner of prolactina inducible protein in human seminal plasma. *International Journal of Biological Macromolecules*, v.50, p.317-322, 2012.
- Lehti, M. S.; Sironen, A. Formation and function of sperm tail structures in association with sperm motility defects. *Biology of Reproduction*, v.97, p.522-536, 2017.
- Leir, S. H.; Browne, J. A.; Eggener, S. E.; Harris, A. Characterization of primary cultures of adult human epididymis epithelial cells. *Fertility and Sterility*, v.103, p.647-654, 2015.
- Li, N.; Wang, T.; Han, D. Structural, cellular and molecular aspects of imune privilege in the testis. *Frontiers in Immunology*, v.3, p.1-12, 2012.
- Lindemann, C. B.; Lesich, K. A. Functional anatomy of the mammalian sperm flagellum. *Cytoskeleton*, v.73, p.652-669, 2016.

- Luetjens, C. M.; Weinbauer, G. F.; Wistuba, J. Primate spermatogenesis: new insights into comparative testicular organisation, spermatogenic efficiency and endocrine control. *Biological Reviews*, v.80, p.475-488, 2005.
- Mann, M. C.; Friess, A. E.; Stoffel, M. H. Blood-tissue barriers in the male reproductive tract of the dog: a morphological study using lanthanum nitrate as an electron-opaque tracer. *Cells Tissue Organs*, v.174, p. 162-169, 2003.
- Master, V. A.; Turek, P. J. Ejaculatory physiology and dysfunction. *Urologic Clinics of North America*, v.28, p.363-375, 2001.
- Meeker, J. D.; Godfrey-Bailey, L.; Hauser, R. Relationships between sérum hormone levels and sêmen quality among men from na infertility clinic. *Journal of Andrology*, v.28, p.397-406, 2007.
- Mikhailichenko, V. V.; Esipov, A. S. Peculiarities of semen coagulation and liquefaction in males from infertile couples. *Fertility & Sterility*, v.84, p.256-259, 2005.
- Miki, K.; Qu, W.; Goulding, E. H.; Willis, W. D.; Bunch, D. O.; Stader, L. F.; Perreault, S. D.; Eddy, E. M.; O'Brien, D. A. 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*, v.101, p.16501-16506, 2004.
- Miller, D. J. Review: The epic journey of sperm through the female reproductive tract. *Animal*, v.12, p.s110-s120, 2018.
- Mital, P.; Hinton, B. T.; Dufour, J. M. The blood-testis and blood-epididymis barriers are more than just their tight junctions. *Biology of Reproduction*, v.84, p.851-858, 2011.
- Molina, L. C. P.; Luque, G. M.; Balestrini, P. A.; Marín-Briggiler, C. I.; Romarowski, A.; Buffone, M. G. Molecular basis of human sperm capacitation. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, v.6, p.1-23, 2018.
- Nagakubo, D.; Taira, T.; Kitaura, H.; Ikeda, M.; Tamai, K.; Iguchi-Ariga, S. M.; Ariga, H. DJ-1, a novel oncogene which transforms mouse NIH3T3 cells in cooperation with ras. *Biochemical Biophysical Research Communication*, v.231, p.509-513, 1997.
- Nakano, F. Y.; Leão, R. B. F.; Esteves, S. C. Insights into the role of cervical mucus and vaginal pH in unexplained infertility. *Medical Express*, v.2, p.1-8, 2015.
- Nallella K. P., Sharma R. K., Aziz N. Agarwal A. Significance of sperm characteristics in the evaluation of male infertility. *Fertility and Sterility*, v.85, p.629-634, 2006.
- Naz, R. K. Application of sperm antigens in immunocontraception. *Frontiers in Bioscience*, v.1, p.87-95, 1996.
- Neto, F. T. L.; Bach, P. V.; Najari, B. B.; Li, P. S.; Goldstein, M. Spermatogenesis in humans and its affecting factors. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, v.59, p.10-26, 2016.
- Nixon, B.; Aitken, R. J.; McLaughlin, E. A. New insights into the molecular mechanisms of sperm-egg interaction. *Cellular and Molecular Life Sciences*, v.64, p.1805-1823, 2007.

- O'Donnell, L.; Stanton, P.; Kretser, D. M. Endocrinology of the male reproductive system and spermatogenesis. In: De Groot, L. J.; Chrousos, G.; Dungan, K.; Feingold, K. R.; Grossman, A.; Hershman, J. M.; Koch, C.; Korbonits, M.; McLachlan, R.; New, M.; Purnell, J.; Rebar, R.; Singer, F.; Vinik, A. Endotext [Internet]. South Dartmouth (MA): MDText.com, 2017.
- O'Rand, M. G.; Widgren, E. E.; Sivashanmugam, P.; Richardson, R. T.; Hall, S. H.; French, F. S.; VandeVoort, C. A.; Ramachandra, S. G.; Ramesh, V.; Jagannadha, R. A. Reversible immunocontraception in male monkeys immunized with eppin. *Science*, v.306, p.1189-1190, 2004.
- Okada, M.; Matsumoto, K.; Niki, T.; Taira, T.; Iguchi-Ariga, S. M. M.; Ariga, H. DJ-1, a target protein for an endocrine disrupter, participates in the fertilization in mice. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, v.25, p.853-856, 2002.
- Olson, G. E.; NagDas, S. K.; Winfrey, V. P. Structural differentiation of spermatozoa during post-testicular maturation. In: Robaire, B. & Hinton, B. T, editors. *The epididymis from molecules to clinical practice. A comprehensive survey of the efferent ducts, the epididymis and the vas deferens*. 2<sup>nd</sup> ed., New York: Springer Science, 2002, p.371-389.
- Ortega-Ferrusola, C.; Gil, M. C.; Rodríguez-Martínez, H.; Anel, L.; Peña, F. J.; Martín-Muñoz, P. Flow cytometry in spermatology: a bright future ahead. *Reproduction in Domestic Animals*, v.52, p.921-931, 2017.
- Osterhoff, C.; Ivell, R.; Kirchoff, C. Cloning of a human epididymis-specific mRNA, HE6, encoding a novel member of the seven transmembrane-domains receptor superfamily. *DNA and Cell Biology*, v.16, p.379-389, 1997.
- Parrish, J. J.; Susko-Parrish, J.; Winer, M. A.; First, N. L. Capacitation of bovine sperm by heparin. *Biology of Reproduction*, v.38, p.1171-1180, 1988.
- Pointis, G.; Fiorini, C.; Defamie, N.; Segretain, D. Gap junctional communication in the male reproductive system. *Biochimica et Biophysica Acta*, v.1719, p.102-116, 2005.
- Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. Diagnostic evaluation of the infertile male: a committee opinion. *Fertility and Sterility*, v.103, p.e18-e25, 2015.
- Primakoff, P.; Lathrop, W.; Woolman, L.; Cowan, A.; Myles, D.; Fully effective contraception in male and female guinea pigs immunized with sperm protein PH-20. *Nature*, v.335, p.543-546, 1988.
- Primakoff, P.; Myles, D. G. Penetration, adhesion, and fusion in mammalian sperm-egg interaction. *Science*, v.296, p.2183-2185, 2002.
- Puppo, V.; Puppo, G. Comprehensive review of the anatomy and physiology of male ejaculation: premature ejaculation is not a disease. *Clinical Anatomy*, v.29, p.111-119, 2016.

- Quill, T. A.; Sugden, S. A.; Rossi, K. L.; Doolittle, L. K.; Hammer, R. E.; Garbers, D. L. Hyperactivated sperm motility driven by CatSper2 is required for fertilization. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v.100, p.14869-14874, 2003.
- Ramanujam, L. N.; Liao, W. X.; Roy, A. C.; Ng, S. C. Association of molecular variants of luteinizing hormone with male infertility. *Human Reproduction*, v.15, p.925-928, 2000.
- Redgrove, K. A.; Nixon, B.; Baker, M. A.; Hetherington, L.; Baker, G.; Liu, D-Y; Aitken, J. The molecular chaperone HSPA2 plays a key role in regulation the expression. Of sperm surfasse receptors that mediate sperm-egg recognition. *Plos One*, v.7, p.e50851-e50851, 2012.
- Ren, D.; Navarro, B.; Perez, G.; Jackson, A. C.; Hsu, S.; Shi, Q.; Tilly, J. L.; Clapman, D. E. A sperm ion channel required for sperm motility and male fertility. *Nature*, v.413, p.603-609, 2001.
- Robaire, B.; Hinton, B. T.; Orgebin-Crist, M. C. The epididymis. In: Neill, J. D., editor, *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*, 3<sup>rd</sup> ed., New York: Elsevier, 2006, p.1071-1148.
- Roberts, K. P.; Wamstad, J. A.; Ensrud, K. M.; Hamilton, D. W. Inhibition of capacitation-associated tyrosine phosphorylation signaling in rat sperm by epididimal protein CRISP-1. *Biology of Reproduction*, v.69, p.572-581, 2003.
- Santolaria, P.; Soler, C.; Recreo, P.; Carretero, T.; Bono, A.; Berné, J. M.; Yániz, J. L. Morphometric and kinetic sperm subpopulations in Split ejaculates of normozoospermic men. *Asian Journal of Andrology*, v.18, p.831-834, 2016.
- Selvam, M. K. P.; Agarwal, A. Update on the proteomics of male infertility: a systematic review. *Arab Journal of Urology*, v.16, p.103-112, 2018.
- Sharma, R. K. Physiology of male gametogenesis. In: Falcone, T.; Hurd, W. W., editors. *Clinical Reproductive Medicine and Surgery – A Practical Guide*, 2<sup>nd</sup> ed., Philadelphia: Elsevier, 2007, p.73-83.
- Sharma, R. K.; Pasqualotto, F. F.; Nelson, D. R.; Thomas, A. J. Agarwal, A. The reactive oxygen species – total antioxidant capacity score is a new measure of oxidative stress to predict male infertility. *Human Reproduction*, v.14, p.2801-2807, 1999.
- Shefi, S.; Turek, P. J. Definition and current evaluation of subfertile men. *International Brazilian Journal of Urology*, v.32, p.385-397, 2006.
- Sheu, G.; Revenig, L. M.; Hsiao, W. Physiology of ejaculation. In: Mulhall, J. P.; Hsiao, W., editors. *Men's sexual health and fertility*. New York: Springer Science, 2014, 13-29.
- Suarez, S. S.; Pacey, A. A. Sperm transport in the female reproductive tract. *Human Reproduction*, v.12, p.23-37, 2006.
- Sullivan, R.; Belleannée, C. Role of the epididymis in sperm maturation. In: Jonge, C. J.; Baratt, C. L. R., editors. *The sperm cell: production, maturation, fertilization, regeneration*. 2<sup>nd</sup> ed., Cambridge: Cambridge University Press, 2017, p.73-87.

- Sullivan, R.; Mieuisset, R. The human epididymis: its function in sperm maturation. *Human Reproduction Update*, v.22, p.574-587, 2016.
- Toshimori, K. Biology of spermatozoa maturation: an overview with an introduction to this issue. *Microscopy Research and Technique*, v.61, p.1-6, 2003.
- Tulsiani, D. R. P.; Abou-Haila, A. Biological processes that prepare mammalian spermatozoa to interact with an egg and fertilize it. *Scientifica*, v.2012, p.1-12, 2012.
- Turek, P. J. Practical approaches to the diagnosis and management of male infertility. *Nature Clinical Practice Urology*, v.2, p.226-238, 2005.
- Turner, T. T. De Graaf's thread: the human epididymis. *Journal of Andrology*, v.29, p.237-250, 2008.
- Turner, T. T., Bomgardner, D.; Jacobs, J. P.; Nguyen, Q. A. T. Association of segmentation of the epididimal interstitium with segmented tubule function in rats and mice. *Reproduction*, v. 125, p.871-878, 2003.
- von Eckardstein, S.; Cooper, T. G.; Rutsch, K.; Meschede, D.; Horst, J.; Nieschlag, E. Seminal plasma characteristics as indicators of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene mutations in men with obstructive azoospermia. *Fertility and Sterility*, v.73, p.1226-1231, 2000.
- Wagenfeld, A.; Gromoll, J.; Cooper, T. G. Molecular cloning and expression of rat contraception associated protein 1 (CAP1), a protein putatively involved in fertilization. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v.251, p.545-549, 1998.
- Walczak-Jedrejowska, R.; Wolski, J. K.; Slowikowska-Hilczer, J. The role of oxidative stress and antioxidants in male fertility. *Central European Journal of Urology*, v.66, p.60-67, 2013.
- Weinbauer, G. F.; Luetjens, C. M.; Simoni, M.; Nieschlag, E. Physiology of Testicular Function. In: Nieschlag, E.; Behre, H. M.; Nieschlag, S., editors. *Andrology: Male Reproductive Health and Dysfunction*. 3<sup>rd</sup> ed., New York: Springer, 2010, p.11-59.
- Welch, J. E.; Barbee, W. R.; Roberts, N. L.; Suarez, J. D.; Klinefelter, G. SP22: a novel fertility protein from a highly conserved gene Family. *Journal of Andrology*, v.19, p.385-393, 1998.
- Whyard, T. C.; Cheung, W.; Sheynkin, Y.; Waltzer, W. C.; Hod, Y. Identification of RS as a flagellar and head sperm protein. *Molecular Reproduction and Development*, v.55, p.189-196, 2000.
- Williams, M.; Barratt, C. L. R.; Hill, C. J.; Warren, M. A.; Dunphy, B.; Cooke, I. D. Recovery of artificially inseminated spermatozoa from the fallopian tubes of a woman undergoing total abdominal hysterectomy. *Human Reproduction*, v.7, p.506-509, 1992.
- Winters, B. R.; Walsh, T. J. The epidemiology of male infertility. *Urologic Clinics of North America*, v.41, p.195-204, 2014.

- Wong, Ching-Hang; Cheng, C. Y. The blood-testis barrier: its biology, regulation, and physiological role in spermatogenesis. *Currents Topics in Developmental Biology*, v.71, p.263-296, 2005.
- World Health Organization. Laboratory manual for the examination and processing of human semen, 5<sup>th</sup> ed., New York: Cambridge University Press, 2010, p.1-271.
- Wright, J.; Duchesne, C.; Sabourin, S.; Bissonnette, F.; Benoit, J.; Girard, Y. Psychosocial distress and infertility: men and women respond differently. *Fertility and Sterility*, v.55, p.100-108, 1991.
- Yeung, C. H.; Perez-Sanches, F.; Schroter, S.; Kirchoff, C.; Cooper, T. G. Changes of the major sperm maturation associated epididimal protein HE5 (CD52) on human ejaculated spermatozoa during incubation. *Molecular Human Reproduction*, v.7, p.617-624, 2001.
- Yoshida, K.; Sato, Y.; yoshiike, M.; Nozawa, S.; Ariga, H.; Iwamoto, T. Immunocytochemical localization of DJ-1 in human male reproductive tissue. *Molecular Reproduction and Development*, v.66, p.391-397, 2003.
- Zegers-Hochschild, F.; Adamson, G. D.; de Mouzon, J.; Ishihara, O.; Mansour, R.; Nygren, K.; Sullivan, E.; Vanderpoel, S.; The International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology; World Health Organization. The international committee for monitoring assisted reproductive technology (ICMART) and the world health organization (WHO) revised glossary of ART terminology, 2009. *Fertility and Sterility*, v.92, p.1520-1524, 2009.
- Zhu, X.; Niharika, P. B.; Evans, J. P. Identification of key functional amino acids of the mouse fertilin B (ADAM2) disintegrin loop for cell-cell adhesion during fertilization. *Journal of Biological Chemistry*, v.275, p.7677-7683, 2000.