



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JULIO DE MESQUITA FILHO
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS
CÂMPUS DE BOTUCATU

**ANÁLISE COMPARATIVA DO PERFIL LIPÍDICO DO PLASMA SEMINAL
ASSOCIADO AO ESTRESSE OXIDATIVO**

Camila Bruna de Lima

Monografia apresentada ao Instituto de
Biociências, Campus de Botucatu, para
obtenção do título de Bacharel em Ciências
Biomédicas.

BOTUCATU – SP

2012



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JULIO DE MESQUITA FILHO
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS
CÂMPUS DE BOTUCATU

**ANÁLISE COMPARATIVA DO PERFIL LIPÍDICO DO PLASMA SEMINAL
ASSOCIADO AO ESTRESSE OXIDATIVO**

Camila Bruna de Lima

Profº Dr. Ricardo Pimenta Bertolla

Monografia apresentada ao Instituto de
Biociências, Campus de Botucatu, para
obtenção do título de Bacharel em Ciências
Biomédicas.

BOTUCATU – SP

2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO DE AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: **ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE**

Lima, Camila Bruna de

Análise comparativa do perfil lipídico do plasma seminal associado ao estresse oxidativo / Camila Bruna de Lima. – Botucatu : [s.n.], 2012

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Ciências Biomédicas) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Ricardo Pimenta Bertolla

Capes: 20801025

1. Stresse oxidativo. 2. Infecundidade masculina. 3. Espectrometria de massas. 4. Sêmen.

Palavras-chave: Espectrometria de massas; Estresse oxidativo; Lipidômica; Plasma seminal.

Dedicatória

Dedico este trabalho a todas as pessoas que acreditam e buscam a realização de seus sonhos, mas principalmente, a todas aquelas que fizeram parte da realização do meu.

“Tenho em mim todos os sonhos do mundo”. (Fernando Pessoa)

Resumo

O estresse oxidativo é um dos fatores mais importantes na diminuição da qualidade do sêmen, pois leva a perda da integridade da membrana dos espermatozóides e de danos estruturais ao DNA através da cascata de lipoperoxidação. Os danos funcionais relacionados ao estresse oxidativo como a diminuição da motilidade e da viabilidade do espermatozoide são algumas das principais causas de infertilidade masculina. Ainda, os lipídios que compõe a membrana plasmática são macromoléculas que, além de estarem envolvidas em complexos sistemas biológicos e processos metabólicos da célula, são altamente susceptíveis ao processo de lipoperoxidação desencadeado pelo estresse oxidativo. Neste contexto, este projeto propôs o estudo das alterações no perfil lipídico do plasma seminal que pudessem estar relacionadas ao estresse oxidativo e posterior comparação destes perfis em busca de biomarcadores de infertilidade. Para isso, foram coletadas amostras de sêmen de 116 pacientes que procuraram o setor de Reprodução Humana da Universidade Federal de São Paulo. Estas amostras foram submetidas a técnica de TBARS para quantificação dos produtos finais do estresse oxidativo e separação dos grupos, e em seguida, ao protocolo de extração de lipídios para obtenção dos espectros de massa através da técnica de MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization). Com esta análise foi possível a identificação de 31 lipídeos super representados nos diferentes grupos e que, futuramente, poderão vir a ser utilizados na avaliação da qualidade seminal.

Análise Comparativa do Perfil Lipídico do Plasma Seminal

Associado ao Estresse Oxidativo

Camila Bruna de Lima^{1,2}, Edson Guimaraes Lo Turco¹, Paula Intasqui Lopes¹, Eduardo Jorge Pilau³, Fabio Cesar Gozzo³, Renato Fraietta¹, Ricardo Pimenta Bertolla¹

¹Universidade Federal de São Paulo, UNIFESP, Departamento de Cirurgia, Divisão de Urologia, Setor de Reprodução Humana, São Paulo, SP.

²Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, UNESP, Campus Botucatu, Distrito de Rubião Júnior, s/n.

³Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, Instituto de Química, Laboratório Dalton de Proteínas.

Introdução

A infertilidade, definida pela Organização Mundial da Saúde como a inabilidade de um casal em alcançar a gravidez após um ano de relações sexuais regulares e desprotegidas [1], é um problema que afeta cerca de 15% dos casais em idade reprodutiva. Nestes, o fator masculino, é responsável por aproximadamente 25% dos casos [2]. Apesar de serem descritas muitas causas para a infertilidade masculina como a varicocele, o criptorquidismo, infecções e causas ambientais como o tabagismo, a fisiopatogenia de diversas destas converge o estresse oxidativo.

O estresse oxidativo (EO) é uma condição associada ao aumento de danos celulares induzidos pelo oxigênio e por suas formas oxidantes, também conhecidas como espécies reativas de oxigênio (EROs) [3]. A produção descontrolada de EROs, quando excede a capacidade antioxidante do plasma seminal, leva ao EO [4] e pode causar infertilidade através de dois mecanismos principais: primeiramente, através do dano a membrana do espermatozóide, reduzindo a motilidade e a habilidade de fusão com o óocito, e segundo, através dos danos diretos ao DNA espermático, podendo levar ao comprometimento da transmissão correta do genoma paterno ao embrião [5].

A etiologia da baixa qualidade seminal ainda não está muito bem elucidada, visto que muitos fatores fisiológicos, ambientais e genéticos, incluindo o EO estão

implicados [2, 6-8]. Por isso, é importante que as condições que afetam as funções espermáticas sejam identificadas com o objetivo de prevenir, ou pelo menos minimizar, seus efeitos e alcançar resultados positivos em casais inférteis onde há predominância do fator masculino.

Fontes de EROs

As espécies reativas de oxigênio representam uma série de moléculas, incluindo radicais (íon hidroxila, ânion superóxido, óxido nítrico, etc.) e não-radicais (ozônio, peróxido de hidrogênio, etc.) que possuem um ou mais elétrons não pareados [9]. Essas moléculas são formadas a partir do metabolismo normal da célula, que utiliza a fosforilação oxidativa durante o processo aeróbico de obtenção de energia pelas mitocôndrias. A redução enzimática do oxigênio tem como produto final os radicais livres, que por serem muito instáveis, atacam a molécula estável mais próxima e a transformam também em um radical, dando início a uma reação em cadeia [5,10].

O ejaculado humano possui diferentes tipos de células como espermatozóides maduros e imaturos, células redondas provenientes de diferentes estágios da espermatogênese, leucócitos e células epiteliais. Dentre estas células, leucócitos e espermatozóides imaturos parecem ser as principais fontes das espécies reativas [11].

O sêmen contém número variável de leucócitos, sendo os neutrófilos o tipo mais predominante. Estes atuam na geração e liberação de EROs durante as respostas citotóxicas contra outras células e patógenos, e tem sido muito investigados nos estudos que buscam estabelecer a correlação entre o estresse oxidativo e a leucocitospermia na diminuição da qualidade seminal. Entretanto, apesar dos esforços, esta relação continua não muito bem definida [12-15].

A produção de radicais livres independente dos leucócitos está ligada ao nível de maturação dos espermatozóides, pois é durante a espermatogênese que o citoplasma,

rico em antioxidantes, é eliminado da célula antes que ela se desprenda do epitélio germinativo. Qualquer falha neste mecanismo de extrusão, faz com que o espermatozóide carregue um excesso de citoplasma, chamado de citoplasma residual, e seja considerado imaturo e funcionalmente defeituoso. [16-18]. Os resíduos citoplasmáticos contêm altos níveis da enzima glicose-6-fosfato desidrogenase, responsável por gerar NADPH, que por sua vez dá origem a EROs através de duas possíveis vias: o sistema NADPH oxidase na membrana espermática e a via da oxidoreductase NADPH-dependente nas mitocôndrias [19,20].

Papéis Fisiológicos das EROs

Nos anos 80, Aitken e seu grupo conduziram estudos pioneiros sobre as espécies reativas de oxigênio no organismo. Até então, acreditava-se que os radicais livres eram apenas tóxicos para os espermatozóides, entretanto, pesquisas mais recentes indicam que a produção de EROs em níveis fisiológicos, e sua presença em quantidades moderadas e controladas, é essencial para o sucesso de processos importantes e que garantem a capacidade de fertilização do espermatozóide [21-24].

As EROs atuam ao longo do trânsito epididimário modificando as proteínas, os lipídeos e características estruturais e bioquímicas do DNA através da oxidação, contribuindo assim para a condensação nuclear, a remodelagem das membranas e a aquisição da motilidade [25,26]. Ainda, a produção de EROs se mostrou fundamental em dois processos importantes e que garantem a fertilização do oócito: a capacitação e a hiperativação do espermatozóide [27].

A capacitação do espermatozóide ocorre já no trato genital feminino e o prepara para a interação com o oócito. Durante este processo, os níveis intracelulares de EROs, cálcio e tirosina quinase se elevam, levando a um aumento na produção de AMPc, que por sua vez, facilita a hiperativação do espermatozóide [28,29]. Apenas os

espermatozóides que sofreram a capacitação, conseguem exibir alta motilidade, passar pelo processo de reação acrossômica e adquirir a capacidade de fertilização [30].

Estudos já realizados também demonstraram que a co-incubação dos espermatozóides em baixas concentrações de algumas espécies reativas de oxigênio como o peróxido de hidrogênio e o óxido nítrico, estimula a capacitação, a reação acrossomal e a hiperativação, além de melhorar a interação espermatozóide-oócito [28, 31,32].

Peroxidação Lipídica

Todos os componentes celulares, inclusive lipídios, proteínas, ácidos nucleicos e açúcares são potenciais alvos do ataque oxidativo. O espermatozóide, especificamente, é altamente susceptível ao EO devido à baixa quantidade de citoplasma onde podem ser encontrados os antioxidantes e à alta concentração de lipídios encontrados na forma de Ácidos Graxos Poliinsaturados (AGPIs).

Os AGPIs como o ácido docosahexaenóico (DHA), ácido eicopentanóico (EPA) e ácido linoléico (ALA), fazem parte da membrana celular e sua presença é imprescindível para a manutenção das propriedades da bicamada lipídica [33]. Estes ácidos também são responsáveis pela fluidez e pela flexibilidade do espermatozóide e, conseqüentemente, pelo sucesso da fertilização [34], mas a presença de ligações duplas entre os carbonos em suas moléculas faz com que fiquem bastante vulneráveis ao ataque dos radicais livres e à iniciação da cascata de lipoperoxidação (LPO) [35].

Os radicais livres oxidam os AGPIs através de uma reação autocatalítica e de autopropagação que uma vez iniciada, não pode ser parada, e que leva a disfunções celulares associadas a perda da integridade e alteração do potencial de membrana. Como conseqüências deste processo temos o aumento da permeabilidade celular, a inativação de enzimas, abalo à integridade do DNA do espermatozóide devido a quebras

nas fitas duplas [36], e principalmente, os danos as membranas das mitocôndrias de forma a diminuir o potencial de membrana e a taxa de ATP intracelular, indispensáveis para o movimento flagelar, situação que acaba comprometendo a motilidade espermática normal [37].

O papel fundamental dos AGPIs na constituição da membrana do espermatozóide e no processo de fertilização foi confirmado através de experimentos feitos em ratos com uma dieta deficiente destes ácidos. Os animais mostraram uma diminuição da concentração sérica de ácidos graxos, degeneração dos túbulos seminíferos, progressiva diminuição da quantidade de células germinativas e ausência de espermatozoides na luz dos túbulos e no epidídimo (Leath *et al.*, 1983).

O nível de lipoperoxidação sofrido pela célula é medido através do malondialdeído (MDA), produto final da lipoperoxidação e um dos biomarcadores do estresse oxidativo [38]. O MDA é um aldeído hidrofílico, de cadeia curta, altamente tóxico para a célula. Sua quantificação baseia-se em um método indireto de mensuração das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) através de absorbância ou fluorescência [39,40].

Espectrometria de Massas (MALDI-TOF MS)

Para que os espermatozoides e o plasma seminal possam ser analisados mais detalhadamente quanto aos componentes de interesse neste estudo, a metabolômica é uma ferramenta importante.

A metabolômica estuda pequenas moléculas como lipídios, aminoácidos, moléculas sinalizadoras, entre outras. Os resultados obtidos nesse tipo de estudo representam a interface entre a informação contida no genoma e o fenótipo funcional da célula. Esta tecnologia permite uma análise mais consistente e mais informativa a respeito de complexos sistemas biológicos como, por exemplo, a identificação das

espécies de lipídios que agem como mensageiros celulares e a maneira com que estas moléculas integram a sinalização e os processos metabólicos da célula [41].

Os lipídios eram considerados apenas componentes de membrana ou de reserva de energia, porém, com o crescimento da lipidômica, o conhecimento sobre estas moléculas aumentou e a melhora na compreensibilidade das análises permitiu melhores abordagens sobre sua interação com outras moléculas, suas funções dentro da célula, mudanças no padrão de composição da bicamada lipídica, eventos de transdução de sinais e outros processos biológicos importantes [42-44]. Alguns estudos sugerem que a estrutura, a viabilidade, a maturação, as funções e o potencial de fertilização do espermatozóide dependem da composição lipídica da membrana plasmática dessa célula e do plasma seminal [45-47]. Além disso, sabe-se que os lipídeos do plasma seminal podem servir como substrato energético para o espermatozóide [48] e parecem atuar na modulação do potencial anti ou pró-oxidativo do sêmen, podendo estar, portanto, diretamente ligados às alterações na integridade da membrana e do DNA de espermatozóides.

Devido à importância dos lipídeos do plasma seminal e do espermatozóide, a caracterização detalhada da composição lipídica dessas amostras é um pré-requisito essencial para entender seu impacto na fertilização e para desenvolver técnicas diagnósticas e terapêuticas na área de reprodução humana [48]. A partir da quantificação do perfil lipídico celular e do estudo da cinética do metabolismo lipídico e das interações dos lipídeos com proteínas celulares, a lipidômica já tem fornecido maiores informações sobre diferentes condições biológicas.

A análise através de Ionização/Desorção de Matriz assistida por laser (MALDI) expandiu significativamente a quantidade de lipídios que pode ser analisada por espectrometria de massas. A variedade nos métodos de ionização possui a habilidade de

gerar íons em fase gasosa a partir de amostras não voláteis, e isso expandiu a capacidade para detecção e análise de um grupo maior de moléculas de diferentes tamanhos e estruturas [49], além de oferecer diversas vantagens como rapidez, simplicidade e estabilidade da fonte de íons. Esta técnica permite a análise exata do peso molecular da amostra, além de conferir alta tolerância aos sais e outras impurezas que possam estar presentes.

A técnica de MALDI é acoplada a detectores de espectrômetro que utilizam as diferenças de tempo-de-vôo (TOF) das moléculas, considerando suas diferenças de tamanho, ou seja, quanto mais leve o íon formado pela molécula, mais rápido ele voará.

No contexto da infertilidade, faz-se necessária, portanto, a avaliação do perfil lipídico dos espermatozóides do plasma seminal de pacientes com alta e baixa taxa de lipoperoxidação. Isso possibilitará a busca de marcadores lipídicos, que, futuramente, poderão ser usados na avaliação da qualidade seminal.

Material e Métodos

Amostras

Foram incluídos neste estudo os pacientes que procuraram o Laboratório de Andrologia do Setor de Reprodução Humana da Disciplina de Urologia, Departamento de Cirurgia da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP). As amostras seminais foram coletadas por masturbação, após um período de 2 a 5 dias de abstinência ejaculatória, em área anexa ao laboratório. Todas as amostras foram coletadas em recipientes de polipropileno estéreis (Bioplass[®], Brasil ou Pleion[®], Brasil). A análise do sêmen foi feita com base nas recomendações da Organização Mundial da Saúde (WHO, 2010) e a morfologia avaliada pelo critério estrito de Kruger (Kruger et al., 1986). Os valores considerados normais foram motilidade $\geq 50\%$ (a + b), concentração $\geq 20 \times 10^6/\text{mL}$ e morfologia acima do valor crítico de 4%.

Separação do plasma seminal

O volume de cada amostra foi centrifugado a 800g por 30 minutos para a separação dos espermatozóides do plasma seminal. Então, este plasma foi transferido para um eppendorff[®], congelado e mantido a - 20°C.

Após o descongelamento, as amostras foram novamente centrifugadas, em velocidade máxima e a 4°C por 30 minutos, para evitar debris celulares.

Nível de peroxidação lipídica

O nível de peroxidação lipídica das amostras foi quantificado pela técnica TBARS, de acordo com o protocolo descrito por Ohkawa et al (OHKAWA et al, 1979). Este método baseia-se na reação de duas moléculas de ácido tiobarbitúrico (TBA) com uma molécula de malondialdeído (MDA), em pH baixo e altas temperaturas, resultando em um complexo avermelhado – MDA (TBA)₂, com absorbância máxima a 532nm e que pode ser quantificado através de um espectrofotômetro.

Após o descongelamento das amostras, adicionou-se 500µL de plasma seminal a 1000µL de uma solução 10% (v:v) de ácido tricloroacético (TCA 10%) e centrifugou-se a 16.100g a 15°C a fim de evitar reações inespecíficas causadas por proteínas. Após 15 minutos de centrifugação, 500µL do sobrenadante juntamente com 500µL de ácido tiobarbitúrico 1% (TBA 1%), em 0,05N de hidróxido de sódio, foram mantidos por 10 minutos em banho-maria (100°C) em tubos de vidro. A seguir, as amostras foram resfriadas em gelo (0°C) para cessar a reação química.

O TBARS foi quantificado utilizando-se um espectrofotômetro em um comprimento de onda de 532nm e uma curva padrão foi previamente preparada com uma solução padrão de malondialdeído para posterior comparação dos resultados. A

concentração de TBARS é determinada usando o valor de $1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (BUEGE & AUST, 1978) e o índice de peroxidação lipídica é descrito como nanogramas de TBARS/mL de sêmen.

Extração de Lipídios

Para a extração de lipídeos foi utilizado o protocolo de extração de Bligh-Dyer (BLIGH EG, DYER WJ, 1959). Onde, em uma primeira etapa, foram aliqüotados 50µL de cada amostra em um microtubo, adicionados 125µL de clorofórmio e 250µL de metanol. A mistura foi levada ao vórtex e em seguida, adicionou-se mais 125µL de clorofórmio e 100µL de água miLi-Q. Então foi feita a centrifugação por 5 minutos a 0,5 rcf em temperatura ambiente. O resultado deste processo é um composto trifásico, onde é possível observar a fase polar representada pelos metabólitos na parte superior, as proteínas na porção intermediária e na parte inferior a fase apolar representada pelos lipídeos. Então, transferiu-se 200µL da camada lipídica para um novo tubo que foi deixado aberto para a evaporação do clorofórmio em temperatura ambiente.

Espectrometria de massas (MALDI - TOF MS)

Os espectros foram obtidos em triplicatas e adquiridos no modo positivo usando um espectrômetro de massas Q-TOF (Waters, Manchester, UK), equipado com laser de 200 Hz de estado sólido em intervalo de 400-1000 m/z. A condição usada para operação principal foi de 10V (placa de amostra), e a irradiação a laser constou de diversos disparos durante o período de 40-90s na região pré-selecionada.

Os espectros obtidos foram centrados e alinhados com o software MassLynx 4.0 (Waters, Manchester, Reino Unido).

Análise Estatística

Para a análise estatística foi utilizado o software SPSS 13.0 para Windows.

Inicialmente, foi feita uma estatística descritiva dos resultados obtidos através da técnica do TBARS. Os pacientes foram divididos em quartis e 25% dos pacientes com maior valor de TBARS e 25% com menor valor foram selecionados para formarem os grupos de alto e baixo nível de peroxidação lipídica, respectivamente.

Quanto ao perfil lipídico do plasma seminal, os espectros gerados por MALDI-TOF foram identificados por massa utilizando o banco de dados HMDB e, posteriormente, comparados entre os grupos através do *Teste T de Student* para amostras independentes e da Análise dos Componentes Principais (PCA). Os componentes principais (CP) obtidos foram submetidos à análise por regressão logística, o que nos permitiu avaliar quais grupos de lipídeos podem estar relacionados com altos níveis de estresse oxidativo. Para tanto, foi utilizado o método *forward stepwise* em que a cada passo é adicionado um componente principal como variável independente visando o modelo com maior significância, até um passo em que não há ganho significativo no modelo. Para os modelos estatísticos foi adotado um α de 5%.

Resultados

Após a análise estatística descritiva dos dados, os 116 pacientes avaliados foram divididos em grupos de alto (n=24) e baixo (n=57) nível de peroxidação lipídica.

Ao todo, foram encontrados 601 lipídeos, dentre os quais 31 apresentaram diferença significativa entre os grupos. Os íons relevantes neste estudo podem ser observados na tabela 1.

m/z	p-value
502,3397	,036
525,6420	,004
576,6169	,025
577,5763	,030
578,5842	,016
586,6399	,043
604,6415	,013
605,6062	,019
606,6100	,014
607,6109	,048
611,5753	,034
627,6054	,030
628,6100	,021
630,6514	,050
632,6788	,008
633,6706	,001
634,6830	,002
651,5815	,009
653,6202	,037
683,6170	,010
740,5694	,038
801,7543	,036
809,7045	,016
810,6985	,011
811,7000	,003
817,7809	,029
833,7228	,017
836,7212	,024
837,7386	,004
838,7411	,003
839,7319	,001

Tabela 1: Íons que apresentaram diferença estatística significativa após realização do Teste *t de Student*.

A partir dos lipídeos identificados, o PCA deu origem a 36 componentes principais. Constatou-se que os componentes que melhor se relacionam com a probabilidade de alto estresse oxidativo no plasma seminal são os componentes 4, 18 e 35. Ainda em relação a estes componentes, temos que a cada unidade de aumento do componente 4, aumenta-se em 3,271 vezes a chance de se ter alta taxa de TBARS e a

cada unidade de aumento do componente 35, aumenta em 6,077 esta mesma probabilidade, de acordo com a tabela 2.

	B	Exp(B)	95% I.C. para EXP(B)	
			Lower	Upper
Componente 4	.628	1.875	1.104	3.183
Constante	1.081	2.948		
Componente 4	1.017	2.765	1.305	5.856
Componente 35	1.664	5.282	2.256	12.366
Constante	2.250	9.490		
Componente 4	1.185	3.271	1.442	7.422
Componente 18	-.985	.373	.148	.940
Componente 35	1.805	6.077	2.365	15.617
Constante	2.761	15.811		

Tabela 2: Resultados da Análise de Componentes Principais (PCA).

De acordo com os dados observados, é possível chegar ao seguinte modelo, através do qual é possível alcançar 81,5% de chances de acerto.

$$EO = 2,761 + [3,271 \times \text{Componente 4}] + [0,373 \times \text{Componente 18}] + [6,077 \times \text{Componente 35}]$$

Na curva ROC, a área sobre a curva é igual a 0.885, como mostrado na tabela 3. Os resultados demonstram a boa acurácia do teste e indicam que o modelo apresenta grande sensibilidade.

Área sob a curva				
Area	Std. Error ^a	Asymptotic Sig. ^b	Asymptotic 95% Confidence Interval	
			Lower Bound	Upper Bound
.885	.036	.000	.814	.955

Tabela 3: Resultado da análise de regressão logística.

No ponto da curva ROC no qual o modelo apresenta-se ideal, temos que a sensibilidade do teste é de aproximadamente 80% e a especificidade é de aproximadamente 16%.

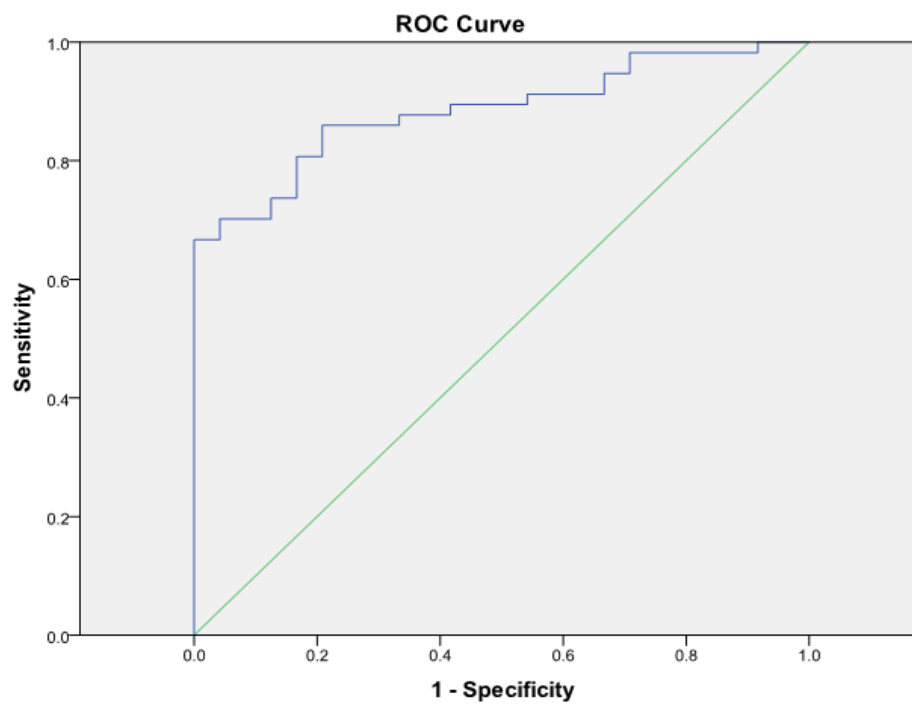


Figura 1: Curva ROC obtida após análise de regressão logística.

Discussão

Através deste estudo, procuramos investigar o perfil lipídico do plasma seminal de pacientes com alta e baixa taxa de peroxidação lipídica através da técnica de MALDI-TOF em busca de potenciais biomarcadores de baixa qualidade seminal ocasionada pelo EO. Embora a literatura descreva muitos eventos intracelulares desencadeados pelo estresse oxidativo, ainda pouco se sabe sobre os papéis específicos dos lipídeos durante esse processo [50].

Dentre as subclasses de lipídeos identificadas nesta pesquisa, é possível observar que algumas estão super representadas no grupo com alta taxa de lipoperoxidação como diacilgliceróis (DAG) e triacilgliceróis (TAG), fosfatidilcolinas (PC) e lisofosfatidilcolinas (LPC), fosfatidilinositóis (PI) e lisofosfatidiletanolaminas (LPE).

Os fosfolipídeos são os principais componentes da bicamada lipídica das membranas, responsável pela manutenção da integridade celular. Além dos fosfolipídeos, ésteres de colesterol, ácidos graxos e proteínas também desempenham funções essenciais [51]. O colesterol, por exemplo, é um importante regulador da arquitetura dos lipídeos [52].

As fosfolipases hidrolizam os fosfolipídeos e dão origem a lipídeos que atuam como segundos mensageiros em inúmeras vias de sinalização celular e também como reguladores na expressão de genes e na proliferação celular [53,54].

Os DAG e TAG são fosfolipídeos ubíquos na natureza e possuem papel de destaque nas vias de sinalização. Esta importante subclasse é responsável pela ativação e o recrutamento de um grande número de proteínas para a membrana, como por exemplo, a proteína quinase C (PKC) e suas isoformas e as proteínas Ras. Os DAG podem também influenciar o transporte de proteínas através do complexo de Golgi [55], além de estarem relacionados à modulação da atividade leucocitária. Devido à sua

extensa distribuição tecidual, era esperado que estas moléculas contribuíssem em diversos processos biológicos [56].

A fosfatidilcolina (PC) é um dos fosfolipídeos mais abundantes nas células dos mamíferos e é sintetizado através da via da colina. A PC é também um dos principais substratos para a fosfolipase D, enzima conhecida por estar envolvida em inúmeros eventos celulares como o rearranjo do citoesqueleto, formação e tráfico de vesículas, fagocitose, entre outras. Estudos demonstraram que perturbações na homeostase da PC no organismo podem levar a célula à morte [57].

Um estudo realizado por Tavidani e seu grupo sugere que pacientes astenozoospermicos possuem quantidades reduzidas de PC. Esta característica pode ser indicativa dos danos causados ao espermatozóide pelas espécies reativas de oxigênio ao oxidarem os AGPIs. O mesmo estudo também encontrou altas quantidades de MDA, produto final da lipoperoxidação, em pacientes com perda de motilidade dos espermatozoides [58].

Outra subclasse encontrada neste estudo, o PI também é um dos componentes da membrana celular eucariótica, entretanto, apesar de aparecer em menores quantidades, também possui papéis biológicos fundamentais. Os PIs servem como ancoragem para várias moléculas sinalizadoras além de serem precursores de segundos mensageiros, mas apesar disso, o que mais chama atenção é o seu papel dinâmico de distribuição pela membrana. Normalmente, eles estão concentrados na face citosólica, mas podem se rapidamente espalhar pelo plano da bicamada quando necessário [59].

Atualmente, a espectrometria de massas (MS) representa um dos métodos mais importantes nas mais diversas áreas devido a sua significativa resolução e alta sensibilidade. A MS tem sido usada cada vez mais medicina, na bioquímica e até em análises de rotina e laboratórios clínicos. Neste contexto, após a análise dos resultados

obtidos neste estudo, é possível sugerir que a abordagem através do MALDI-TOF/MS, foi capaz de identificar a presença de quantidades significativas de lipídeos de membrana no plasma seminal dos pacientes do grupo com alta taxa de lipoperoxidação, o que sugere que a membrana dos espermatozóides tenha sofrido danos relacionados ao ataque oxidativo. Da mesma forma, levando em consideração os inúmeros papéis biológicos que os lipídeos exercem, sugerimos que mesmo pequenas alterações do perfil lipídico podem ser indicativas de alterações fisiológicas importantes nos espermatozóides.

As alterações na quantidade de PC, PI e DAG, por exemplo, podem servir como potenciais biomarcadores de infertilidade masculina associada aos danos causados pelas espécies reativas de oxigênio na membrana dos espermatozóides. Em vista disso, este estudo é de extrema relevância na busca por técnicas de avaliação do estresse oxidativo que possam ser simplificadas e validadas para que, futuramente, possam ser utilizadas na prática clínica.

Referências Bibliográficas

- [1] Rowe PJ, Comhaire FH, Hargreave TB, Mahmoud AMA. WHO Manual for the Standardized Investigation, Diagnosis and Management of the Infertile Male. Cambridge University Press, Cambridge, 2000.
- [2] Sharlip ID, Jarow JP, Belker AM et al. Best practice policies for male infertility. *Fertil. Steril.* 2002; 77: 873–82.
- [3] Sikka SC, Rajasekaran M, Hellstrom WJG. Role of oxidative stress and antioxidants in male infertility. *Journal of Andrology*, 1995; 16(6), p. 464–468.
- [4] Desai NR, Mahfouz R, Sharma R, Gupta S, Agarwal A. Reactive oxygen species levels are independent of sperm concentration, motility, and abstinence in a normal, healthy, proven fertileman: a longitudinal study. *Fertil. Steril.*, 2010; 94(4), p. 1541–1543.
- [5] Tremellen K. Oxidative stress and male infertility – a clinical perspective. *Human Reproduction Update*, 2008; 14(3), p. 243–258.
- [6] Vine MF. Smoking and male reproduction: A review. *Int. J. Androl.* 1996; 19, p. 323–37.
- [7] Auger J, Eustache F, Andersen AG et al. Sperm morphological defects related to environment, lifestyle and medical history of 1001 male partners of pregnant women from four European cities. *Hum. Reprod.*, 2001; 16, p. 2710–7.
- [8] Kenkel S, Rolf C, Nieschlag E. Occupational risks for male fertility: An analysis of patients attending a tertiary referral centre. *Int. J. Androl.* 2001; 24, p. 318–26.
- [9] Pons-Rejraji H, Sion B, Saez F, Brugnon F, Janny L, Grizard G. Rôles des dérivés actifs de l’oxygène (DAO) sur les spermatozoïdes humains et infertilité masculine. *Gynécologie Obstétrique & Fertilité*, 2009; 39, p. 529–535.
- [10] Cocuzza M, Sikka SC, Athayde KS, Agarwal A. Clinical Relevance of Oxidative Stress and Sperm Chromatin Damage in Male Infertility: An Evidence Based Analysis. *International Braz J Urol.*, 2007, 33(5), p. 603-621.

- [11] Garrido N, Meseguer M, Simon C, Pellicer A, Remohi J. Pro-oxidative and anti-oxidative imbalance in human semen and its relation with male fertility. *Asian Journal of Andrology*, 2004; 6, p. 59-65.
- [12] Ochsendorf FR. Infections in the male genital tract and reactive oxygen species. *Hum. Reprod. Update*, 1999; 5, p. 399–420.
- [13] Saleh RA, Agarwal A. Oxidative stress and male infertility: From research bench to clinical practice. *J. Androl.* 2002; 23, p. 737–52.
- [14] Aitken RJ, Baker HW. Seminal leukocytes: Passengers, terrorists or good Samaritans? *Hum. Reprod.* 1995; 10, p. 1736–9.
- [15] Saleh RA, Agarwal A, Kandirali E et al. Leukocytospermia is associated with increased reactive oxygen species production by human spermatozoa. *Fertil. Steril.*, 2002; 78, p. 1215–24.
- [16] Makker K, Agarwal A, Sharma R. Oxidative stress & male infertility. *Indian J Med Res.*, 2009, 129, p. 357-367.
- [17] Fisher H, Aitken R. Comparative analysis of the ability of precursor germ cells and epididymal spermatozoa to generate reactive oxygen metabolites. *J. Exp. Zool.*, 1997; 277, p. 390–400.
- [18] Said TM, Agarwal A, Sharma RK, Thomas AJ, Sikka SC. Impact of sperm morphology on DNA damage caused by oxidative stress induced by beta-nicotinamide adenine dinucleotide phosphate. *Fertil. Steril.* 2005; 83, p. 95–103.
- [19] Aitken RJ, Buckingham DW, West KM: Reactive oxygen species and human spermatozoa: analysis of the cellular mechanisms involved in luminol- and lucigenin-dependent chemiluminescence. *J Cell Physiol.*, 1992; 151, p. 466–477.
- [20] Gavella M, Lipovac V: NADH-dependent oxidoreductase (diaphorase) activity and isozyme pattern of sperm in infertile men. *Arch Androl.*, 1992; 28, p. 135–141.
- [21] Aitken RJ. Molecular mechanisms regulating human sperm function. *Mol Hum Reprod.*, 1997; 3, p. 169-73.

- [22] Aitken RJ. The Amoroso Lecture. The human spermatozoon - a cell in crisis? *J Reprod Fertil* 1999; 115 : 1-7.
- [23] Gagnon C, Iwasaki A, De Lamirande E, Kovalski N. Reactive oxygen species and human spermatozoa. *Ann N Y Acad Sci* 1991; 637 : 436-44.
- [24] Ford WC. Regulation of sperm function by reactive oxygen species. *Hum Reprod Update*, 2004;10, p. 387-99.
- [25] Vernet P, Aitken RJ, Drevet JR. Antioxidant strategies in the epididymis. *Mol Cell Endocrinol.*, 2004; 216, p. 31-9.
- [26] Aitken RJ, Vernet P. Maturation of redox regulatory mechanisms in the epididymis. *J Reprod Fertil Suppl.*, 1998; 53, p. 109-18.
- [27] E. de Lamirande and C. Gagnon. A positive role for the superoxide anion in triggering hyperactivation and capacitation of human spermatozoa. *International Journal of Andrology*, 1993; 16(1), p. 21-25.
- [28]. Aitken RJ. Free radicals, lipid peroxidation and sperm function. *Reprod Fertil Dev.*, 1995; 7, p. 659-68.
- [29] Visconti PE, Moore GD, Bailey JL, Leclerc P, Connors SA, Pan D, et al. Capacitation of mouse spermatozoa. II. Protein tyrosine phosphorylation and capacitation are regulated by a cAMP-dependent pathway. *Development*, 1995; 121, p. 1139-50.
- [30] de Lamirande E, Leclerc P, Gagnon C. Capacitation as a regulatory event that primes spermatozoa for the acrosome reaction and fertilization. *Mol Hum Reprod* 1997; 3 : 175-94.
- [31] de Lamirande E, Gagnon C. Human sperm hyperactivation and capacitation as parts of an oxidative process. *Free Radic Biol Med.*, 1993; 14, p. 157-66.
- [32] Kodama H, Kuribayashi Y, Gagnon C. Effect of sperm lipid peroxidation on fertilization. *J Androl.*, 1996; 17, p. 151-7.
- [33] Farooqui AA, Horrocks LA, Farooqui T. Glycerophospholipids in brain: their metabolism, incorporation into membranes, functions, and involvement in neurological disorders. *Chemistry and Physics of Lipids*, 2000; 106(1), p. 1-29.

- [34] Lenzi A, Gandini L, Maresca V, et al. Fatty acid composition of spermatozoa and immature germ cells. *Mol Hum Reprod.*, 2000; 6, p. 226–231.
- [35] Bansal AK and Bilaspuri GS. Impacts of oxidative stress and antioxidants on semen function. *Veterinary Medicine International*, 2010.
- [36] Zini A, de Lamirande E, Gagnon C. Reactive oxygen species in semen of infertile patients: levels of superoxide dismutase- and catalase-like activities in seminal plasma and spermatozoa. *International Journal of Andrology*, 1993; 16, p. 183–8.
- [37] Sies H, Stahe W. Vitamins E and C, beta- carotene, and other carotenoids as antioxidants. *American Journal of Clinical Nutrition*, 1995; 62, p. 1315S-21S.
- [38] Bonnes Taourel D, Guérin MC., Torreilles J. Is malonaldehyde a valuable of peroxidation?. *Biochemical Pharmacology*, 1992; 44, p. 985-8.
- [39] Janero DJ. Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity indices of lipid peroxidation and peroxidative injury. *Free Radical Biology and Medicine*, 1990; 9, p. 515-40.
- [40] Slater TF. Overview of methods used for detecting lipid peroxidation. *Methods in Enzymology*, 1984; 105, p. 283-93.
- [41] Revelli A, Delle Piane L, Casano S, Molinari E, Massobrio M, Rinaudo P. Follicular fluid content and oocyte quality: from single biochemical markers to metabolomics, 2009; 4, p. 7-40.
- [42] Wenk M. The emerging field of lipidomics. *Nat Rev Drug Discov.*, 2005; 4, p. 594–610.
- [43] Van Meer G. Cellular lipidomics. *The EMBO J* 2005; 24, p. 3159–3165.
- [44] Watson AD. Lipidomics – a global approach to lipid analysis in biological systems. *J Lipid Res*, 2006; 47, p. 2101–2111.
- [45] Beer-Ljubic B, Aladrovic J, Marenjak TS, Laskaj R, Majic-Balic I, Milinkovic-Tur S. Cholesterol concentration in seminal plasma as a predictive tool for quality semen evaluation. *Theriogenology*, 2009; 72, p. 1132–40.

- [46] Flesch FM. and Gadella BM. Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. *Biochimica et Biophysica Acta.*, 2000; 1469, p. 197-235.
- [47] Aksoy Y, Aksoy H, Altinkaynak K, Aydın HR, Özkan A. Sperm fatty acid composition in subfertile men. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 2006; 75, p. 75–79.
- [48] Fuchs B, Jakop U, Göritz F, Hermes R, Hildebrandt T, Schiller J, Müller K. MALDI-TOF “fingerprint” phospholipid mass spectra allow the differentiation between ruminantia and feroideae spermatozoa. *Theriogenology*, 2009; 71, p. 568–575.
- [49] Murphy RC, Fiedler J, Hevko J. Analysis of nonvolatile lipids by mass spectrometry. *Chem Ver.*, 2001; 101, p. 479–526.
- [50] Petersen, RB, Nunomura, A, Lee, HG, Casadesus G, Perry G, Smith MA, Zhu X. Signal transduction cascades associated with oxidative stress in Alzheimer’s disease. *J. Alzheimers Dis.*, 2007; 11, p. 143–152.
- [51] Catala A. Lipid peroxidation of membrane phospholipids generates hydroxy-alkenals and oxidized phospholipids active in physiological and/or pathological conditions. *Chem. Phys. Lipids*, 2009, 157(1), p. 1–11.
- [52] Saher G, Brugger B, Lappe-Siefke C, Mobius W, Tozawa R, Wehr MC, Wieland F, Ishibashi S, Nave KA. High cholesterol level is essential for myelin membrane growth. *Nat. Neurosci.*, 2005; 8(4), p. 468–475.
- [53] Farooqui AA., Horrocks LA. Phospholipase A2-generated lipid mediators in the brain: the good, the bad, and the ugly. *Neuroscientist*, 2006; 12(3), p. 245–260.
- [54] Eyster KM. The membrane and lipids as integral participants in signal transduction: lipid signal transduction for the non-lipid biochemist. *Adv. Physiol. Educ.*, 2007; 31, p. 5–16.
- [55] [19] Asp L, Kartberg F, Rodriguez JF, Smedh M, Elsner M, Laporte F, Barcena M, Jansen KA, Valentijn JA, Koster AJ, Bergeron JJM, Nilsson T. Early stages of golgi vesicle and tubule formation require diacylglycerol. *Mol Biol Cell.*, 2009; 20, p. 780-790.
- [56] Shulga YV, Topham MK, Epand RM. Regulation and Functions of Diacylglycerol Kinases. *Chem. Rev.*, 2011; 111, p. 6186–6208.

[57] Hattori H., Kanfer JN. Synaptosomal phospholipase D: potential role in providing choline for acetylcholine synthesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1984; 124, p. 945–949.

[58] Tavalani H, Doostib M, Nourmohammadic I, Mahjubd H, Vaisirayganie A, Salimif S, Hosseinipanaheg SM. Lipid composition of spermatozoa in normozoospermic and asthenozoospermic males. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 2007; 77, p. 45–50.

[59] Shewan A, Eastburn DJ, Mostov K. *Phosphoinositides in Cell Architecture*. Cold Spring Harb Perspect Biol 2011.

Agradecimentos

Aos meus pais agradeço simplesmente por tudo. Nenhum espaço e nenhuma palavra seriam suficientes para expressar a intensidade do meu amor e do meu agradecimento a vocês. Muito obrigada por acreditarem em mim e na minha capacidade, por todo o esforço que vocês fizeram e ainda fazem pela minha felicidade. Este caminho está apenas começando e eu espero poder um dia retribuir cada um dos sacrifícios que vocês fizeram por mim. Amo vocês!

A toda a minha família. À Pih, por ser este anjo na minha vida, a Zita e Paulo pelo apoio e amor incondicional. Aos meus avós, tios e primos por estarem sempre ao meu lado amparando as minhas quedas e comemorando as minhas vitórias. Cada um de vocês é muito especial.

Ao Murillo (Musa), por ter sido meu porto seguro. Um dos maiores responsáveis por eu ter chegado até aqui. Por ter me incentivado, por ter sido a força que muitas vezes eu não tive. Por me ensinar tanto e construir comigo a pessoa que eu sou hoje. Por colocar um pouco de razão e clareza nos meus pensamentos quando eu não conseguia fazê-lo. Por agüentar cada uma das minhas manias e realizar todas as minhas vontades. Pelo seu dom de me fazer feliz. Obrigada pelo amor e pelos sonhos que nós dividimos e por todos os momentos intensos que passamos juntos em nossas vidas.

À Juliana e Marcos, meus irmãos. Qualquer palavra que eu diga será sempre insuficiente para expressar a imensidão do meu amor, da minha confiança e da minha gratidão pela existência de vocês na minha vida. Obrigada por estarem presentes em todos os momentos importantes e também por estarem lá nos momentos de descontração. Por todas as nossas waffles, nossos cafés, nossos papos nerds, confidências, abraços, choros e risos. Obrigada por jamais terem me abandonado, mesmo com toda a distância que nos separava. Porque isso é para sempre, e nós sabemos que para sempre tem um significado muito maior.

À Natasha (Flex), não só por ser a pessoa com que eu dividi meu quarto, mas a pessoa com a qual eu dividi minha vida nestes anos de Botucatu. Por todas as nossas conversas de madrugada, nossos estudos desesperados, nossas lágrimas de alegria e de tristeza, por tudo que vivenciamos juntas não só na faculdade. Por todas as nossas dúvidas e opiniões parecidas, por nossos medos e inseguranças, por toda a cumplicidade, por todas as vezes em que simplesmente fomos companheiras.

À Janaína (Mitaka), muito obrigada por tornar meus almoços sempre mais divertidos. Obrigada pela amizade de sempre, por todas as nossas aventuras, nossas besteiras e até mesmo pelas nossas briguinhas nos seus dias mal humorados. Obrigada pelas vezes que precisei do seu colo pra chorar. Obrigada por fazer minha barriga doer de tanto rir. Obrigada por estar sempre ao meu lado.

À Bianca (Peks), por ser essa pessoa maravilhosa e iluminada que eu tive a felicidade de ter no meu caminho. Porque a saudade e a distância só fizeram aumentar o sentimento e a força dessa amizade. Por todas as vezes que usamos roupas iguais, pelas caronas, pelas conversas, pelas histórias que fizeram valer meus anos em Botucatu. Obrigada por ser tão especial.

À Marília (Kktua) por ser uma agradável surpresa em minha vida. Obrigada por deixar de ser apenas mais uma das minhas veteranas e se tornar de fato uma amiga. Obrigada por todos os momentos divertidos que temos vivido.

Ao Vinícius (Zuka), por todas as festas, todas as nossas danças, nossos passinhos ensaiados, nosso tombos. Obrigada pela companhia sempre. E obrigada por fazer todo o nosso trabalho e nossas dificuldades na comissão de formatura valerem a pena.

A República Mash, simplesmente por ser muito mais do que minha casa. É a segunda família, que me acolheu em seus braços desde o primeiro minuto. A Prof com o seu jeito de cuidar de nós, a Mixinga pelas risadas intermináveis, o Xu, por ser uma pessoa tão incrível e tão cativante. Taguinha, não sei como eu estaria me formando se não fosse sua ajuda na hora das provas, se você não me levasse no hospital e segurasse a minha mão sempre. Raitec, você sempre deu vida a nossa casa, obrigada por momentos tão divertidos! Joelms, por ser essa pequena que eu amo tanto e que eu gostaria de poder cuidar como se fosse minha irmã. Montana, obrigada por ser a mãezona da casa, esse seu jeito bravo é simplesmente encantador. Para as bixetes, que já chegaram ou vão chegar, cuidem bem desse lugar, porque assim sempre teremos para onde voltar.

A Comissão Organizadora da Interbiomed, por ter me acolhido desde o primeiro ano de faculdade. Por todo o crescimento que eu tenho o prazer de ter acompanhado. Por terem me dado a felicidade do campeonato, mesmo que eu não saiba jogar nada. Por ter me mostrado que cada mínimo esforço individual faz um trabalho em grupo ser cada vez maior, ganhar força e ser recompensado.

À Paula Intasqui, por ser uma pessoa encantadora e cativante. Obrigada por todos os nossos dias divertidos de fofocas, de preocupações, de correrias. Obrigada por me ajudar sempre e também por não me deixar esquecer minha cabeça de vez em quando. Sem você, com certeza este trabalho não teria sido realizado.

Ao Ricardo Pimenta Bertolla pela oportunidade que me deu, por acreditar que eu poderia fazer um bom trabalho e por tudo que me ensinou neste período.

To Theresa Henssen, for being part of my life during one of the most amazing moments of my University! Life is crazy sometimes. Who could ever guess how close we'd become? Thanks for sharing with me so many special moments that I will never forget. You are much more than a good friend. Thanks for being this "one in a million" person who is so close no matter how far!