



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

Resumo	1
Abstract	3
Introdução	5
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
Justificativa e Objetivos	35
Material e Métodos	37
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

Resultados	48
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
Discussão	63
Conclusões	68
Referências Bibliográficas	70
Comitê de Ética	83
Termo de Consentimento	89
Anamnese	92
Apêndices	94

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 esfinteriano, 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.

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

Fonte: Adaptado de WHO, 2010.

Tabela 2. Nomenclatura relacionada à qualidade seminal.

Nomenclatura	Definição
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).

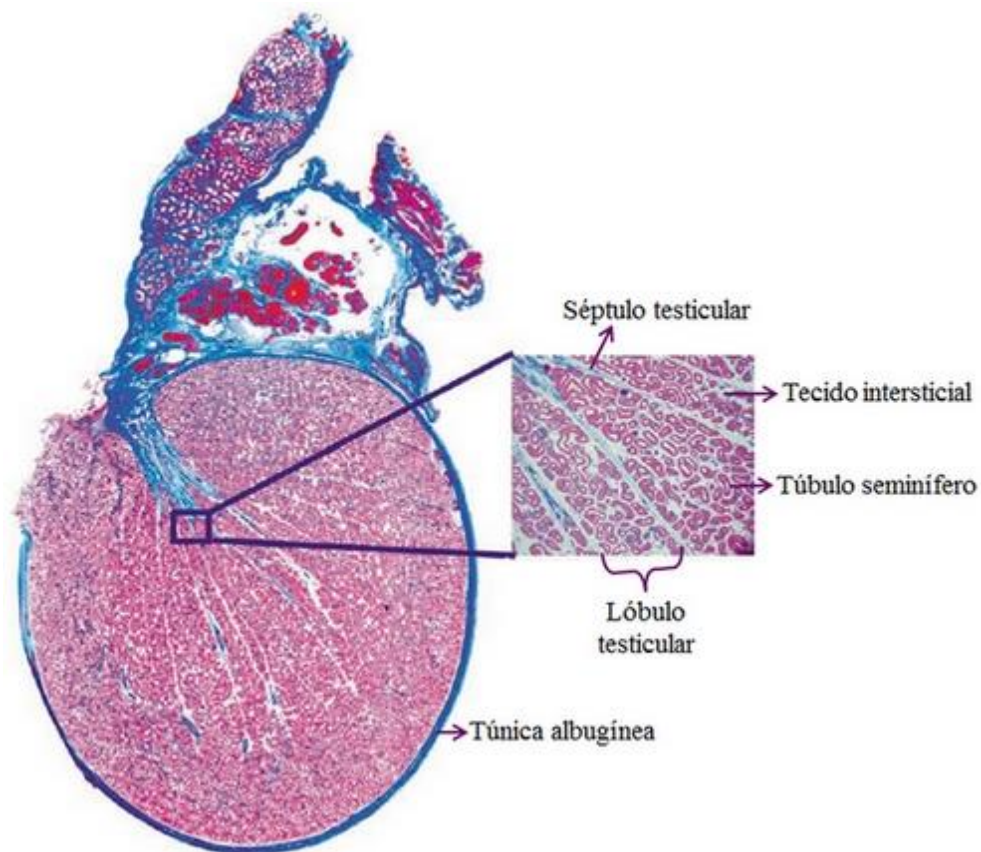


Figura 1. Secção transversal de testículo humano.

Fonte: Adaptado de Weinbauer *et al.*, 2010.

O tecido intersticial é constituído por células de Leydig, fibras nervosas, fibroblastos, vasos sanguíneos e linfáticos bem como por diversas células do sistema imune incluindo macrófagos e linfócitos (Holstein *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2012). Já os túbulos seminíferos, unidade funcional dos testículos (Cheng & Mruk, 2002; Neto *et al.*, 2016), que são estruturas altamente enoveladas (Li *et al.*, 2012), podendo atingir um comprimento de aproximadamente 720 metros em um homem (Weinbauer *et al.*, 2010) e ocupar entre 60 a 80% do volume testicular total, são compostos pelo lúmen e pelo epitélio germinativo, que é circundado por várias camadas de tecido peritubular, a lâmina própria (Holstein *et al.*, 2003; Weinbauer *et al.*, 2010; Neto *et al.*, 2016).

O epitélio germinativo é formado pelas células somáticas, as células de Sertoli, e pelas células germinativas em diferentes estágios de desenvolvimento (Holstein *et al.*, 2003; Weinbauer *et al.*, 2010; Neto *et al.*, 2016). As células de Sertoli, que ocupam entre 17 a 20% do epitélio em um homem adulto, exibem alinhamento polarizado com a base repousando sobre a membrana basal e o ápice apontando para o lúmen do túbulo de maneira que se

estendem ao longo de todo o epitélio germinativo. Aliado a esse posicionamento, a morfologia irregular e em constante mudança com proeminentes ramificações e projeções citoplasmáticas, envolvem as células germinativas e as auxiliam na migração para o lúmen tubular durante o seu desenvolvimento (Figura 2) (França *et al.*, 2016; Neto *et al.*, 2016).

Além dessas funções de suporte estrutural e funcional (Pointis *et al.*, 2005; Mital *et al.*, 2011), as células de Sertoli desempenham outras funções diversas como direcionar o desenvolvimento gonadal masculino, durante a embriogênese testicular, sintetizar a proteína ligadora de andrógenos, inibina B e outros componentes que contribuem para o microambiente em que as células germinativas maturam. Além disso, fagocitam corpos residuais provenientes de espermátides e células germinativas em degeneração (Neto *et al.*, 2016) bem como separam anatomicamente o epitélio germinativo nos compartimentos basal e adluminal através da barreira de células de Sertoli (Figura 2) (Wong & Cheng, 2005; Cheng *et al.*, 2011; Mital *et al.*, 2011), que se estabelecem durante a puberdade, entre os 12 e 14 anos de idade (Cheng & Mruk, 2010).

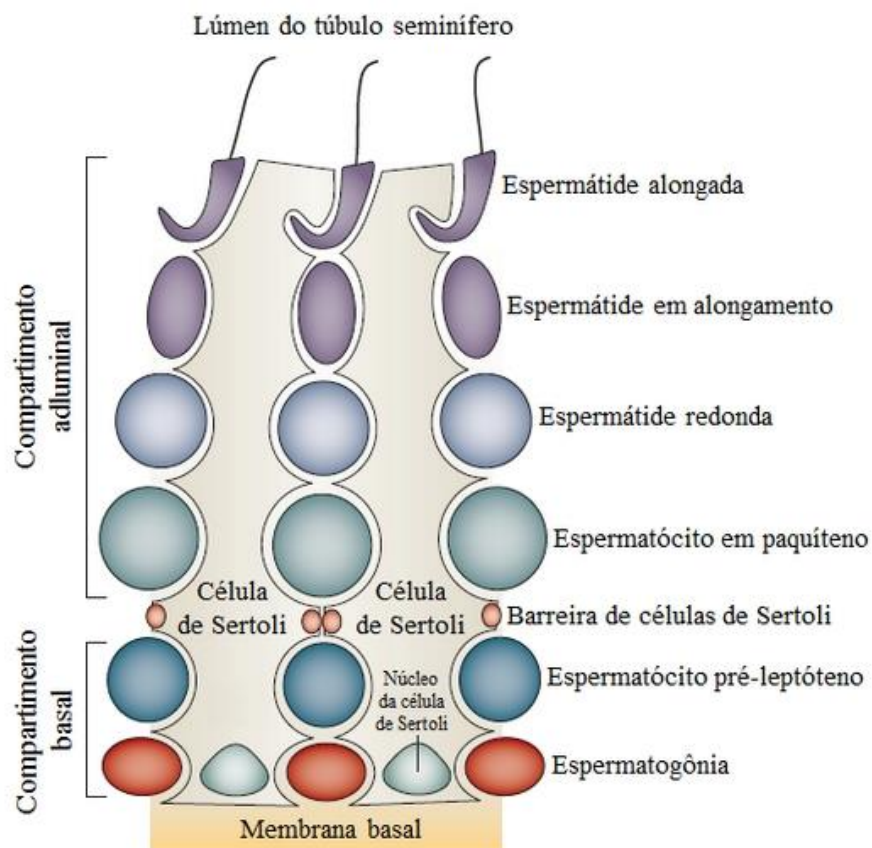


Figura 2. Representação esquemática de corte transversal do túbulo seminífero.

Fonte: Adaptado de Cheng & Mruk, 2010.

As células germinativas, únicas células capazes de passar pelo processo de meiose, compreendem uma família de células cuja única finalidade é se transformar em espermatozoides e, assim, transmitir informações genéticas e epigenéticas entre as gerações (Neto *et al.*, 2016). Até o momento, 14 tipos de células germinativas humanas foram identificadas e classificadas em ordem crescente de maturação: espermatogônias do tipo A escuras, espermatogônias do tipo A pálidas, espermatogônias do tipo B, espermatócitos primários pré-leptóteno, leptóteno, zigóteno e paquíteno, espermatócitos secundários e espermátides Sa, Sb1, Sb2, Sc, Sd1 e Sd2 (Clermont, 1963; Neto *et al.*, 2016).

O processo completo de desenvolvimento de uma espermatogônia até a formação do espermatozoide é denominado espermatogênese. Esse processo tem início na puberdade após longo período preparatório de “pré-espermatogênese” no feto e no pré-púbere (Holstein *et al.*, 2003) e continua durante toda a vida do indivíduo (Sharma, 2007). Em humanos, esse processo que leva em torno de 74 dias (Amann, 2009), é diferente dos outros mamíferos e entre as diferenças está a baixa produção espermática diária (Sharma, 2007; Amann, 2008), que varia de 3 a 4 milhões de espermatozoides (Sharma, 2007), e a complexa organização tridimensional do epitélio germinativo (Amann, 2008), onde as células germinativas estão dispostas em uma sequência altamente ordenada com as espermatogônias e espermatócitos precoces ocupando o compartimento basal e as demais células o compartimento adluminal (Figura 2) (Sharma, 2007; Weinbauer *et al.*, 2010; Neto *et al.*, 2016).

As células germinativas se desenvolvem sincronicamente em agrupamentos consistentes denominados de associações celulares (Amann, 2008; Weinbauer *et al.*, 2010; Neto *et al.*, 2016). Essas associações são estabelecidas durante as sucessivas mitoses das espermatogônias do tipo B que mantêm as células-filhas interconectadas por pontes citoplasmáticas que são desfeitas apenas em fases avançadas da espermátide em desenvolvimento (Holstein *et al.*, 2003; O'Donnell *et al.*, 2017). Em humanos, existem seis associações celulares diferentes e cada associação, que tem duração de 16 dias, é considerada um estágio no ciclo espermatogênico (Sharma, 2007; Amann, 2008; Weinbauer *et al.*, 2010; Neto *et al.*, 2016). Homens com baixa produção de espermatozoides podem mostrar associações celulares atípicas devido à falta de células germinativas ou mistura de associações (Neto *et al.*, 2016).

Estudos em modelos animais mostraram que o arranjo espacial das associações celulares está organizado em ondas ao longo do epitélio germinativo. Já em humanos, os primeiros estudos falharam em encontrar o mesmo padrão e descreveram a espermatogênese humana

al., 2016). Portanto, o pool de células-tronco é essencial para a espermatogênese e para a fertilidade masculina e condições que comprometam esse pool podem levar à subfertilidade ou infertilidade (Gassei & Orwing, 2016).

A decisão se a espermatogônia irá se autorenovar, diferenciar ou se tornar apoptótica é principalmente influenciada por fatores derivados das células de Sertoli (Neto *et al.*, 2016). Em humanos, essas células são capazes de suportar aproximadamente 10 células germinativas (Weinbauer *et al.*, 2010) e o processo de apoptose é utilizado para controlar o número de células em desenvolvimento e manter constante essa proporção. O mecanismo de autorenovação espermatogonial é induzido pelo fator neurotrófico derivado de células da glia, o de diferenciação promovido pelo fator de células tronco, proteína morfogenética óssea 4, ácido retinoico e Notch1/Jagged2 e o de apoptose induzido pelo sistema *fas*/*FaSL* e modulado pela Bcl-2, Bax e fator de necrose tumoral alfa, sendo que qualquer distúrbio em um desses mecanismos pode afetar o potencial fértil masculino (Neto *et al.*, 2016).

Assim que as espermatogônias do tipo A pálidas se diferenciam em espermatogônias do tipo B, essas células sofrem uma divisão mitótica e originam os espermatócitos primários, fato que marca o final da fase proliferativa da espermatogênese (Neto *et al.*, 2016). A meiose I dos espermatócitos tem início ainda no compartimento basal do epitélio germinativo dando origem aos espermatócitos pré-leptótenos (Figura 4) (Holstein *et al.*, 2003) que atravessam a barreira de células de Sertoli para o compartimento adluminal, onde se tornam imunologicamente isolados e prosseguem na meiose. O processo de recombinação do DNA ocorre durante o estágio de paquíteno e é crucial para a evolução humana. Mais de 45% dos homens que apresentam concentração, motilidade e morfologia espermáticas normais e cuja parceira sofre aborto recorrente, exibem número de espermatozoides aneuploides elevado. Tais homens podem ter risco aumentado de produzir prole cromossomicamente anormal e deveriam ter aconselhamento genético (Neto *et al.*, 2016).

Os espermatócitos secundários formados ao final da primeira divisão meiótica rapidamente se dividem, através da meiose II, e originam as espermátides redondas haploides Sa (Figura 4). Uma característica importante tanto dos espermatócitos como das espermátides é a dependência de lactato como fonte principal de energia. A glicose fornecida as células de Sertoli via transportadores específicos de glicose, GLUT1, é processada glicolicamente em lactato que é transferido as células germinativas via transportadores monocarboxilados, sendo

que o FSH, andrógenos, insulina e alguns fatores parácrinos estimulam esse processo e interferentes podem causar infertilidade masculina (Neto *et al.*, 2016).

A espermiogênese é o processo pelo qual as espermatídes redondas se transformam através de mudanças dramáticas em espermatozoides (Figura 4) (Neto *et al.*, 2016). Durante essa transformação uma série de eventos acontece como remodelamento do núcleo, que migra para uma posição excêntrica, compactação da cromatina e formação do acrossomo a partir do complexo de Golgi (Ortega-Ferrusola *et al.*, 2017). Concomitantemente, a cauda do espermatozoide se forma a partir do centríolo, gradualmente alongando a forma da espermatíde, e mitocôndrias aumentam em número e circundam a base da cauda formando a peça intermediária. A fim de maximizar a motilidade dos espermatozoides, em formação, o excesso de citoplasma remanescente do complexo de Golgi e de outras organelas é removido formando o corpo residual (Neto *et al.*, 2016). Ainda durante a espermiogênese, ocorre a aquisição de marcadores epigenéticos que incluem metilação do DNA, modificações de histonas e regulação por microRNAs (Fraser & Lin, 2016). Uma vez que as espermatídes são completamente metamorfozadas são destacadas das células de Sertoli e liberadas no lúmen do túbulo em um processo designado espermição, que é FSH e testosterona dependente. Embora defeitos na espermição não sejam isoladamente uma causa de infertilidade podem contribuir em muitos casos (Neto *et al.*, 2016).

A intensa compactação e remodelamento da cromatina pela substituição de histonas por protaminas, que ocorrem durante a espermiogênese, protegem o genoma paterno durante a sua jornada até o ovócito e silencia toda a transcrição nuclear, o que implica na ausência de síntese proteica em espermatozoides maduros, que dependem de modificações pós-traducionais para regular a sua função (Fraser & Lin, 2016).

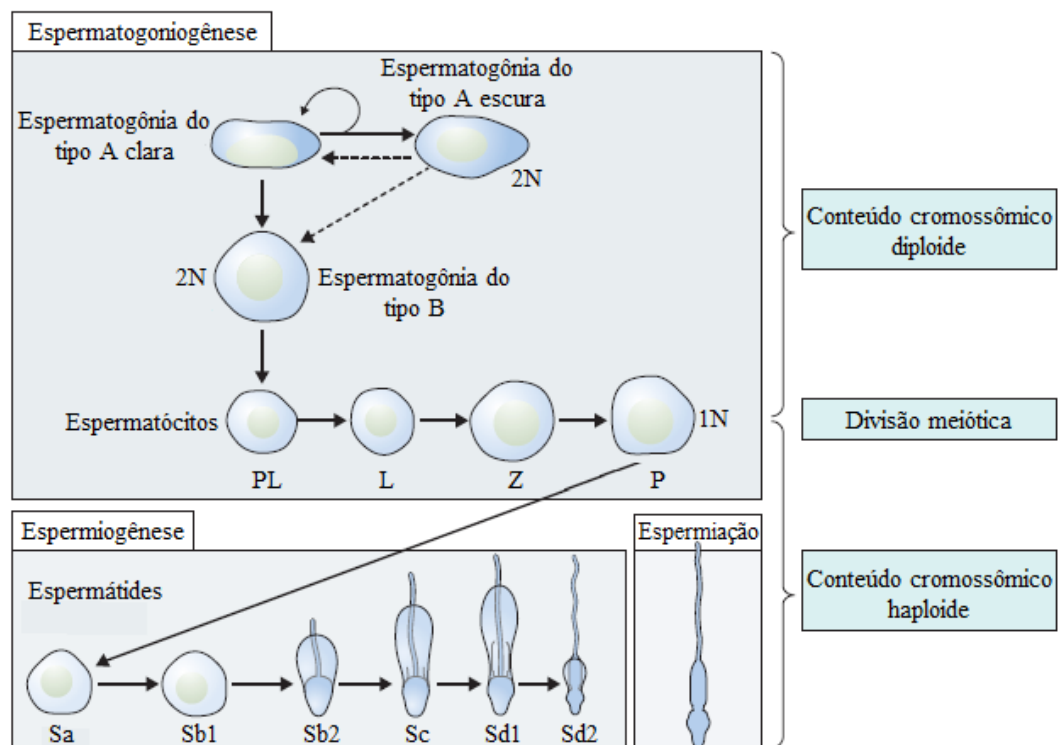


Figura 4. Representação dos diferentes tipos de células germinativas durante o processo espermatogênico.

Fonte: Adaptado de Sharma, 2007.

O espermatozoide é uma célula altamente especializada constituída pela cabeça, pescoço e cauda. A cabeça, que contém o núcleo com o material genético, é uma estrutura ovoide achatada que mede entre 4 a 5,5 μm de comprimento e 2,5 a 3,5 μm de largura e é recoberta, em cerca de 40% a 70% na sua porção anterior pelo acrossomo (Sharma, 2007), uma estrutura semelhante a um saco que contém enzimas essenciais para a penetração do espermatozoide no ovócito (Abou-Haila & Tulsiani, 2000). O acrossomo se estende uniformemente até o segmento equatorial dividindo a cabeça de maneira desigual em 2 regiões, a acrossomal ou acrossomo anterior e a pós-acrossomal ou acrossomo posterior (Abou-Haila & Tulsiani, 2000; Sharma, 2007). Já o pescoço é uma estrutura independente e frágil que contém o centríolo e une a cabeça à cauda (Toshimori, 2003), que tem entre 40 a 50 μm de comprimento, surge a partir do centríolo e é subdividida em três regiões: peça intermediária, peça principal e peça final (Figura 5) (Toshimori, 2003; Sharma, 2007). A peça intermediária e a peça principal são separadas pelo annulus, que é uma estrutura em forma de anel elétron densa e cuja depleção de proteínas específicas nessa estrutura está associada a um anel desorganizado, alterações na morfologia da cauda e imotilidade (Figura 6) (Lehti & Sirone, 2017).

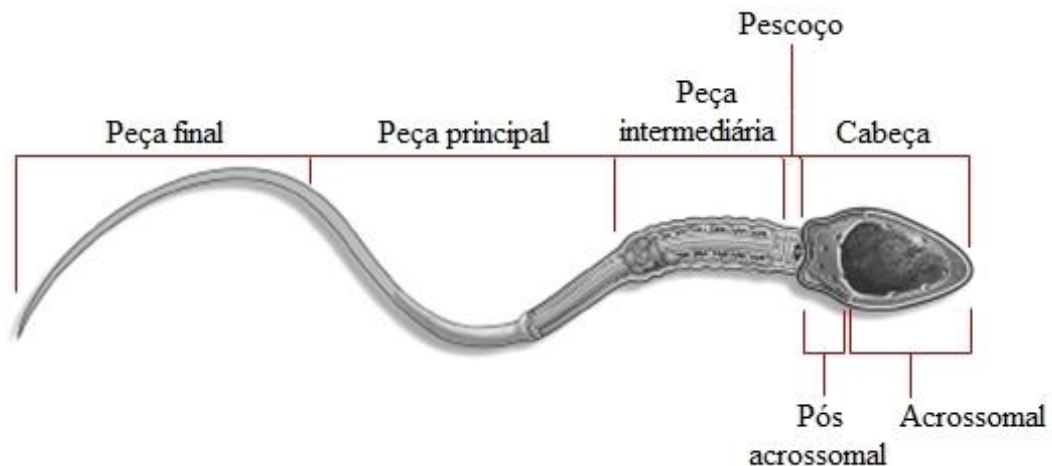


Figura 5. Estrutura do espermatozoide humano.

Fonte: Adaptado a partir de Sharma, 2007 e Agarwal *et al.*, 2014.

A estrutura interna da cauda é constituída pelo axonema central circundando por fibras densas externas – *outer dense fibers* (ODFs), pela bainha mitocondrial – *mitochondrial sheath* (MS) e pela bainha fibrosa – *fibrous sheath* (FS), sendo que essas estruturas variam dependendo da região. O axonema, que se forma a partir do centríolo e se estende distalmente por toda a cauda, é composto por 9 microtúbulos duplos externos em torno de 2 microtúbulos simples centrais, estrutura conhecida como 9 + 2 (Figura 6) (Fawcett, 1917; Toshimori, 2003; Inaba, 2011; Lindemann & Lesich, 2016). Cada um dos pares de microtúbulos externos possui duas fileiras de projeções de proteínas motoras de dineína que são a fonte da força motriz da cauda. As ODFs, que são ausentes na porção mais distal da peça final, são formadas por nove fibras grandes de material queratinoso que se emparelham com cada um dos microtúbulos duplos do axonema (Figura 6) (Lindemann & Lesich, 2016). É suposto que as ODFs sejam estruturas motoras que evoluíram para superar a maior resistência encontrada nas secreções do sistema genital feminino (Fawcett, 1917).

A MS é um cordão espiral, composto por mitocôndrias, que se enrola ao redor da peça intermediária e apresenta comprimento bem diversificado entre as espécies, com cerca 12 voltas em humanos, a mais de 200 em alguns roedores (Fawcett, 1917). Já a FS, consiste de duas colunas longitudinais conectadas por numerosas nervuras semicirculares, que envolvem a ODF e o axonema na peça principal e vai se tornando progressivamente mais fina em direção à peça final (Figura 6). Tanto a MS como a FS fornecem suporte mecânico adicional à

cauda e aumentam a sua rigidez. Além do papel mecânico, as bainhas, juntamente, com as ODFs desempenham função no metabolismo e na sinalização (Lindemann & Lesich, 2016).

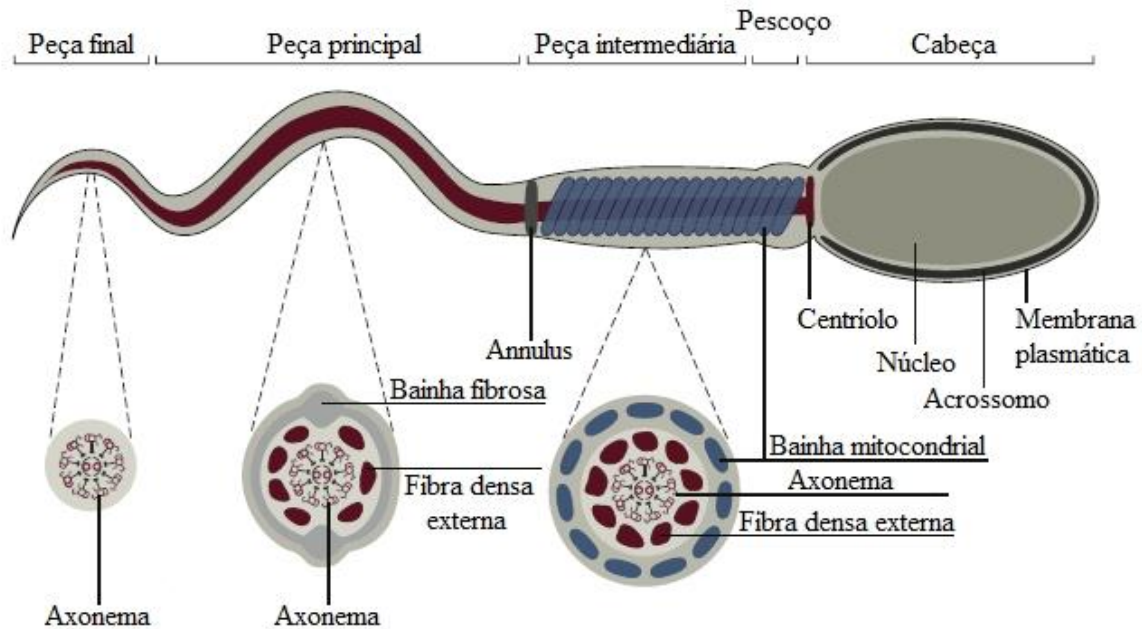


Figura 6. Representação esquemática de espermatozoide de mamífero, em corte transversal. Fonte: Adaptado de Brache *et al.*, 2018.

O espermatozoide humano quando comparado com o da maioria das outras espécies, são de qualidade extremamente inferior, conforme demonstrado por sua morfologia, motilidade e competência funcional. Uma vez que até metade desses gametas liberados pelos testículos morrem e se desintegram dentro do epidídimo, onde são reabsorvidos, somente uma parcela dos espermatozoides passam pelo processo de maturação epididimária (Sharma, 2007).

EPIDÍDIMO E MATURAÇÃO ESPERMÁTICA

O gameta masculino produzido no testículo, através de modificações celulares geneticamente controladas (Dacheux *et al.*, 2003; Dacheux *et al.*, 2005), é funcionalmente imaturo e requer diferenciação adicional no epidídimo para se tornar progressivamente móvel e com capacidade de reconhecer e fertilizar o ovócito. Essa diferenciação pós-gonadal, referida como maturação espermiática, é um processo andrógeno dependente pelo qual o espermatozoide é submetido a uma série de mudanças bioquímicas e funcionais (Cohen *et al.*, 2011), que são em grande parte consequência da interação com o ambiente luminal epididimário, uma vez que as habilidades de transcrição e tradução são perdidas durante os

últimos estágios de diferenciação das espermatídes e, portanto, não estão sob regulação genômica do gameta (Figura 7) (Olson *et al.*, 2002; Cornwall & Horsten, 2007; Cohen *et al.*, 2011). Além da maturação espermática, o epidídimo também desempenha papel importante no transporte, concentração, proteção e armazenamento dos espermatozoides (Hermo & Robaire, 2002), processos essenciais cuja ausência ou depleção pode ser fator significativo para infertilidade masculina (Arrotéia *et al.*, 2012).

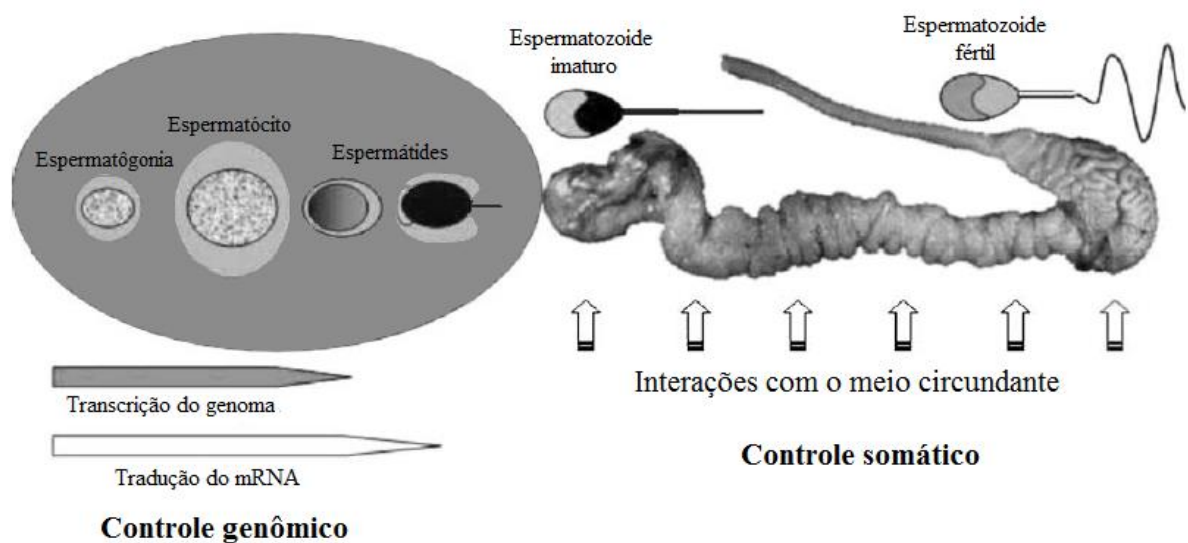


Figura 7. Representação esquemática do processo de formação e controle do gameta masculino através do testículo e epidídimo.

Fonte: Adaptado de Dacheux *et al.*, 2005.

O epidídimo, um órgão que se encontra na borda dorsolateral de cada testículo (Dacheux *et al.*, 2003; Dacheux *et al.*, 2005; Sharma, 2007; Dacheux & Dacheux, 2014) e conecta os ductos eferentes ao ducto deferente (Sullivan & Beleanne, 2017), é caracterizado por ser um túbulo único altamente enovelado cuja parte proximal é denominada de *globus major*, que recebe os espermatozoides e fluidos intraluminais do testículo, e a parte distal de *globus minor*, que é envolta pelo coxim adiposo epididimário (Figura 8A) (Turner, 2008). Em todos os mamíferos, esse órgão é anatomicamente dividido em 3 regiões amplas: cabeça, corpo e cauda, e abriga características morfológicas específicas da espécie (Sullivan & Mieusset, 2016). Uma particularidade do epidídimo humano, que intacto apresenta comprimento estimado entre 10 a 12 centímetros e desenovelado entre 5 a 7 metros (Turner, 2008), são essas regiões pouco diferenciadas, dado que a cabeça não apresenta aparência bulbosa e a cauda os característicos túbulos volumosos, o que a torna pouco distinguível do corpo e do

ducto deferente (Figura 8B). Outra peculiaridade é que a extremidade proximal da cabeça é formada principalmente por ductos eferentes, pequenos túbulos que ligam a rete testicular ao epidídimo, e que juntamente com a cabeça desempenham importante papel na reabsorção de água e, portanto, na concentração dos espermatozoides (Hess, 2002; Sullivan & Beleannée, 2017).

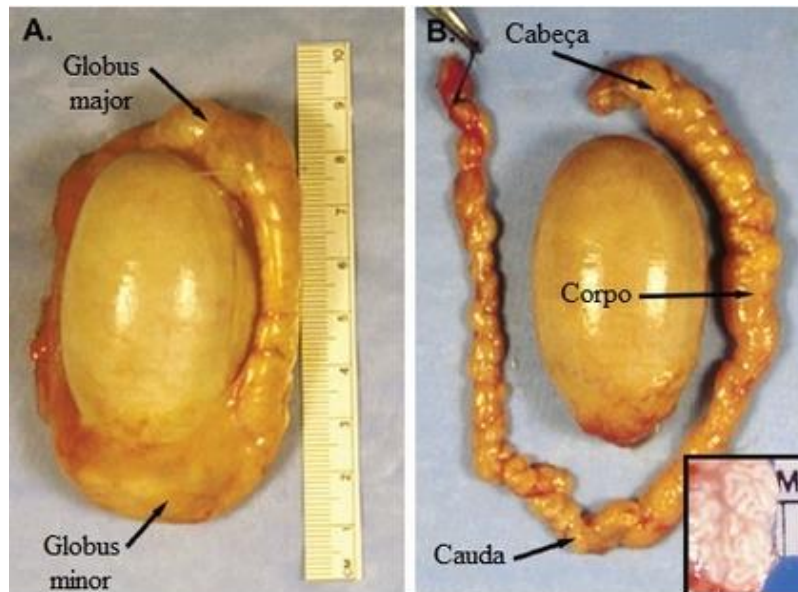


Figura 8. Testículo e epidídimo humano intactos removidos do escroto (A). Testículo e epidídimo parcialmente dissecados com a gordura epididimária removida (B). Inserção: visão ampliada dos túbulos. As duas linhas verticais à direita indicam 1 mm.

Fonte: Adaptado de Turner, 2008.

As regiões epididimárias são constituídas pelo lúmen revestido por um epitélio pseudoestratificado com diferentes tipos celulares que incluem as células principais, basais, claras e halo, sendo as células principais o tipo mais abundante deste epitélio (Hermo & Robaire, 2002), que no homem aumenta de espessura progressivamente da região mais proximal da cabeça em direção ao corpo, onde atinge o seu máximo, o que indica secreção mais ativa de proteínas nessa região, e diminui da região mais distal do corpo em direção à cauda (Sullivan & Beleannée, 2017). As células principais sintetizam grande quantidade de proteínas que ficam retidas dentro da própria célula ou são secretadas ativamente no compartimento luminal, bem como participam ativamente na endocitose de proteínas presentes no lúmen (Robaire *et al.*, 2006), sendo, portanto, responsáveis pela concentração proteica do ambiente luminal (Arrotéia *et al.*, 2012). Além disso, junções de oclusão entre

células principais adjacentes formam a barreira hemato-epididimária que assegura um compartimento intraluminal isolado e protege os espermatozoides de reações autoimunes, uma vez que essas células permanecem no sistema genital masculino durante semanas antes de serem liberadas (Mann *et al.*, 2003; Sullivan & Beleannée, 2017). Embora os outros tipos celulares tenham sido claramente descritos em modelos animais, a distribuição e função no epitélio epididimário humano ainda precisam ser investigadas (Sullivan & Beleannée, 2017).

Apesar dos tipos celulares serem os mesmos ao longo de todo o comprimento do órgão, o padrão estrutural e de expressão gênica é diferenciado o que contribui para as distintas funções fisiológicas de cada região (Leir *et al.*, 2015), sendo que a cabeça e o corpo atuam nos eventos maturacionais de espermatozoides precoces e tardios, respectivamente, enquanto a cauda permanece principalmente como local de armazenamento dos espermatozoides maduros (Cornwall & Horsten, 2007).

Além da divisão anatômica, as regiões do epidídimo são subdivididas em segmentos intrarregionais discretos com base na presença de septos de tecido conjuntivo (Cornwall & Horsten, 2007). No ser humano esses septos, que são pouco desenvolvidos e incompletos (Sullivan & Mieusset, 2016), delimitam 8 segmentos (Cooper & Yeung, 2006) enquanto, que em camundongos e ratos são bem desenvolvidos e definem 10 e 19 segmentos, respectivamente (Figura 9) (Sullivan & Mieusset, 2016). Diversos estudos têm demonstrado que a expressão gênica específica na região da cabeça, corpo e cauda são precisamente limitadas nas fronteiras desses segmentos intrarregionais que estabelecem padrão de secreção altamente regionalizado, o que contribui para a formação de microambientes peculiares em cada região (Turner *et al.*, 2003). Esses microambientes, que diferem tanto em termos de conteúdo proteico e composição química como tensão de oxigênio e pH, desempenham papel essencial no controle ou na indução da maturação (Dacheux *et al.*, 2012) e qualquer alteração em uma dessas características pode levar a distúrbios da fertilidade e conservação do espermatozoide (Dacheux *et al.*, 2005).

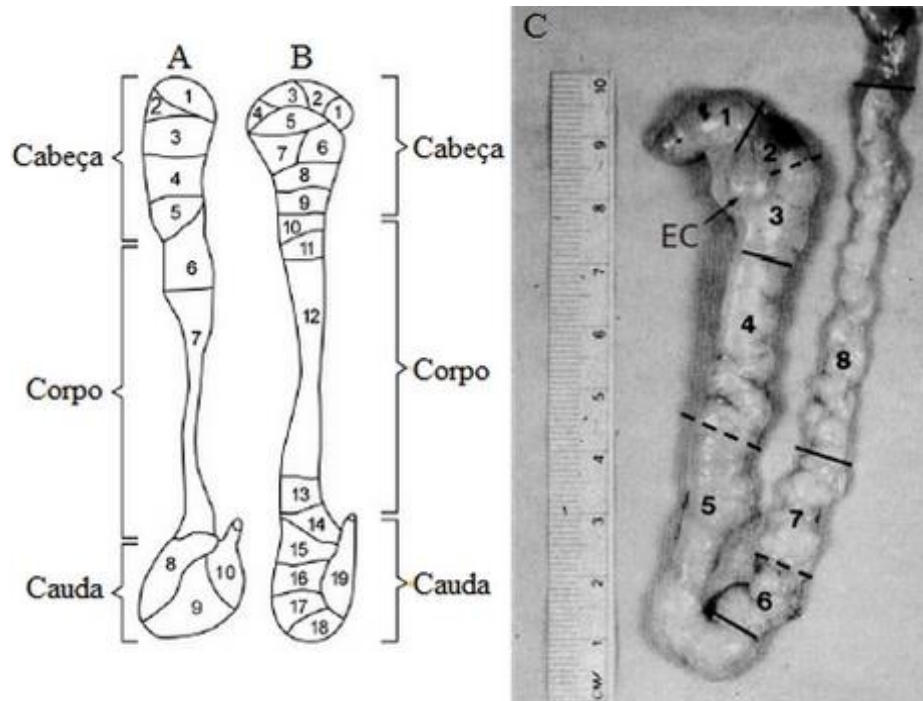


Figura 9. Estrutura segmentar do epidídimo. Ilustração típica dos segmentos do epidídimo de camundongo (A) e rato (B) e epidídimo humano com os seus segmentos (C).

Fonte: (A) Adaptado de Jelinsky *et al.*, 2007 e (B) adaptado de Cooper & Yeung, 2006.

O processo de maturação espermática envolve tanto a migração da gota citoplasmática e alterações no batimento flagelar (Sullivan & Mieusset, 2016; Gervasi & Visconti, 2017) como extenso remodelamento na membrana plasmática que é organizada em domínios específicos definidos por subconjuntos distintos de lipídeos e proteínas (Toshimori, 2003; Gatti *et al.*, 2004). Esse remodelamento inclui proteólise de proteínas testiculares preexistentes, redistribuição de proteínas específicas entre domínios (Olson *et al.*, 2002; Toshimori, 2003) e aquisição de novas proteínas de origem epididimária (Cornwall & Horsten, 2007), bem como relocalização de antígenos de superfície, modificações de glicoproteínas e na composição lipídica (Olson *et al.*, 2002; Gervasi & Visconti, 20017; Sullivan & Beleannée, 2017). Muitas das proteínas testiculares que são processadas durante a maturação espermática são propostas como importantes na interação dos gametas durante a fertilização (Cuasnicú *et al.*, 2002).

Em humanos, a passagem dos espermatozoides pelo epidídimo através da cabeça e corpo até chegar à cauda leva em torno de 12 dias (Robaire *et al.*, 2006) e esses espermatozoides maduros permanecem na cauda epididimária, que contém cerca de 70% de todos os espermatozoides presentes no sistema reprodutor, até o momento da ejaculação (Sharma, 2007).

EJACULAÇÃO

O desejo sexual, excitação, orgasmo e ejaculação são uma sucessão de fases intimamente relacionadas e descritas para a resposta sexual humana. Embora o orgasmo seja frequentemente associado à ejaculação, são dois processos fisiológicos distintos (Alwaal *et al.*, 2015; Clement & Giuliano, 2016), sendo o orgasmo caracterizado por sensações físicas e emocionais que, na maioria das vezes, coincide com a ejaculação (Master & Turek, 2001; Sheu *et al.*, 2014).

A ejaculação envolve diferentes estruturas anatômicas fortemente coordenadas por componentes simpáticos, parassimpáticos e somáticos do sistema nervoso e é constituída por duas fases sucessivas, a emissão e a expulsão (Giuliano & Clement, 2005a; Alwaal *et al.*, 2015). A emissão começa com o fechamento do colo da bexiga, para impedir o fluxo retrógrado de espermatozoides, e progride com contrações da musculatura lisa da cauda distal do epidídimo e do ducto deferente para mover o fluido rico em espermatozoides para dentro da uretra prostática, onde é diluído e misturado com secreções das glândulas sexuais acessórias. A expulsão, fase posterior a essa deposição, é uma reação reflexa da uretra ao acúmulo desse fluido que culmina na sua propulsão forçada para fora do corpo, através de contrações rítmicas intensas de músculos estriados pélvicos e do esfíncter uretral (Amann, 2009; Clement & Giuliano, 2016; Puppo & Puppo, 2016).

O ejaculado de mamíferos é composto por espermatozoides, fluido epididimário e secreções das glândulas sexuais acessórias (Ortega-Ferrusola *et al.*, 2017) e podem ter volume único como nos ruminantes ou ser fracionado como nos humanos, onde os fluidos das glândulas acessórias são liberados em sequência ordenada e específica, sendo, portanto, o ejaculado composto por frações diferentes que incluem a fase pré-ejaculatória, a primeira e a segunda fração ejaculada. A fase pré-ejaculatória não contém espermatozoides e é uma reação das glândulas de Cowper ou bulbouretrais e periuretrais que secretam uma solução alcalina com glicoproteínas que neutralizam a acidez do sistema urinário e o lubrifica antes da ejaculação (Cooper & Yeung, 2010). Já a primeira fração do ejaculado, que representa de 15 a 45% do ejaculado total, contém secreções da próstata, do epidídimo e dos vasos deferentes e é rica em espermatozoides com plasma seminal pobre em proteínas. Enquanto a segunda fração, que constitui os 55 a 85% restantes do volume ejaculado total, contém apenas secreções das vesículas seminais e exibe número reduzido de espermatozoides com plasma seminal rico em proteínas (Ortega-Ferrusola *et al.*, 2017).

Devido o processo espermatogênico ser dinâmico e contínuo, a reserva de espermatozoides na cauda epididimária é composta por muitas gerações de espermatogêneses. Assim, nem toda população espermática em um mesmo ejaculado é oriunda de uma única geração ou apresenta o mesmo status fisiológico (Ortega-Ferrusola *et al.*, 2017), sendo, portanto, o ejaculado composto por subpopulações. Existem evidências crescentes de que a heterogeneidade entre essas subpopulações tem relevância funcional, com os espermatozoides da primeira fração apresentando melhor motilidade e potencial fértil (Santolaria *et al.*, 2016).

O conceito de heterogeneidade espermática, introduzido na década de 90, mudou o modelo competitivo de fecundação, onde grande número de espermatozoides competia para alcançar e fertilizar o ovócito (Ortega-Ferrusola *et al.*, 2017). Williams *et al.* (1992) demonstraram, através de espermatozoides inseminados artificialmente, em uma mulher submetida a histerectomia abdominal total, que das centenas de milhões de espermatozoides depositados na vagina, apenas mil ou menos eram recuperados nas tubas uterinas, o que deixou nítido que, de fato, poucos dos espermatozoides ejaculados conseguem entrar nas tubas uterinas, sendo que o número dos que se tornam aptos a fertilizar, após a capacitação é ainda menor (Eisenbach & Giojalas, 2006).

JORNADA DO ESPERMATOZOIDE E CAPACITAÇÃO ESPERMÁTICA

Um fato bem conhecido é que apesar de um grande número de espermatozoides serem depositados no sistema genital feminino, apenas um em particular, irá alcançar e fertilizar o ovócito (García-Vásquez *et al.*, 2016). O local de deposição dos espermatozoides ejaculados varia nos diferentes mamíferos e essas distinções estão relacionadas ao volume e características anatômicas de cada espécie. Em humanos, essa deposição acontece na vagina superior, próximo à abertura cervical (Ortega-Ferrusola *et al.*, 2017), onde os espermatozoides iniciam a sua célebre jornada pelo sistema genital feminino (Figura 10) sendo expostos a diferentes ambientes, barreiras físicas e células potencialmente hostis do sistema imunológico (Aitken, 2013; Miller, 2018).

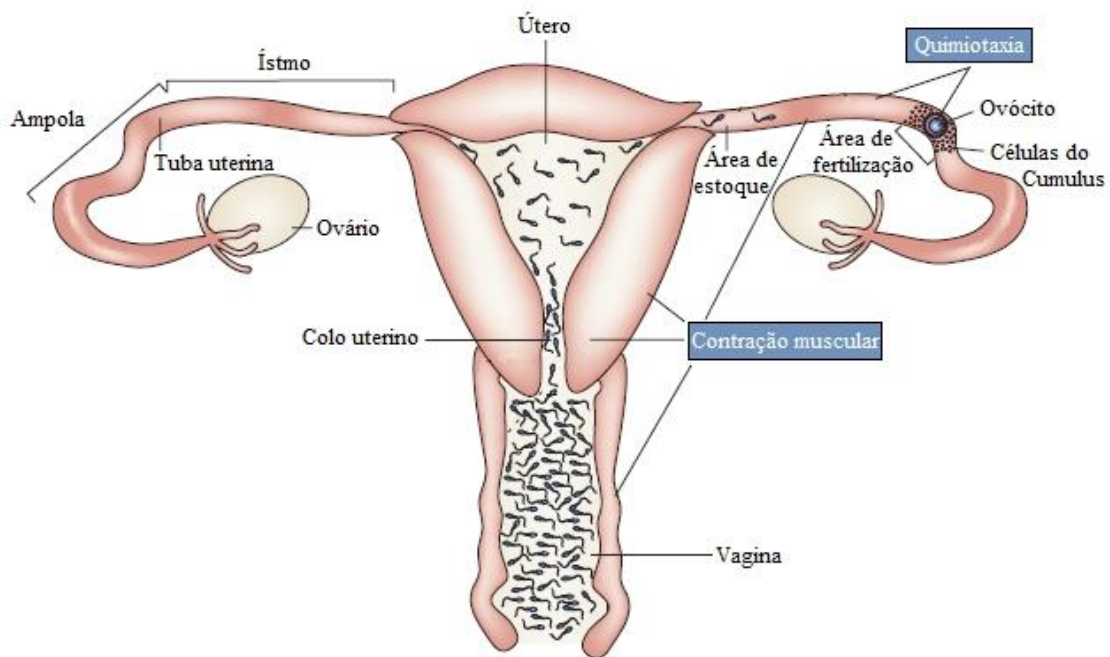


Figura 10. Representação esquemática do sistema genital feminino.

Fonte: Adaptado de Eisenbach & Giojalas, 2006.

Imediatamente após a ejaculação, o sêmen humano sob influência de proteínas presentes nas secreções das glândulas seminais forma um coágulo (Mikhailichenko & Esipov, 2005), semelhante a um gel (Suarez & Pacey, 2006), que temporariamente restringe o movimento dos espermatozoides. Esse coágulo, que é gradualmente liquefeito, em aproximadamente 20 a 30 minutos, por enzimas proteolíticas produzidas pela próstata, mantém os espermatozoides próximos ao orifício cervical e os protege do pH vaginal ácido. A deficiência nas secreções prostáticas, geralmente causada por processos infecciosos, está relacionada com a ausência de liquefação ou liquefação parcial. Como consequência, os espermatozoides permanecem agrupados dentro do coágulo altamente viscoso, o que prejudica a capacidade desses gametas em atravessar o colo uterino (Nakano *et al.*, 2015).

O transporte dos espermatozoides pelo colo uterino depende tanto da motilidade espermática como das atividades musculares da vagina, do próprio colo e do útero. Os espermatozoides que entram nessa região encontram o muco cervical (Suarez & Pacey, 2006), que muda em resposta à fase do ciclo menstrual, sendo mais fluido antes da ovulação e mais denso após a ovulação. Esse muco se estabelece como uma barreira natural importante para o sistema genital feminino superior (Han *et al.*, 2017) bem como atua na seleção de espermatozoides, já que representa um obstáculo para gametas anormais que não podem nadar

adequadamente ou que apresentam perfil hidrodinâmico fraco (Suarez & Pacey, 2006). A passagem por essa região, onde ocorre a maior redução no número de espermatozoides, representa o primeiro local de seleção espermática (Croxatto, 2002).

Uma vez no útero, os espermatozoides são dirigidos passivamente para a pequena abertura na junção útero-tubária por ondas de contrações da musculatura lisa do útero. É durante esse transporte pela cavidade uterina que se inicia a capacitação espermática (Aitken & Nixon, 2013) através da liberação progressiva de moléculas conhecidas como fatores de decapacitação, adquiridas a partir do fluido epididimário e plasma seminal, e que mantêm os espermatozoides em um estado não capacitado. É suposto que quando esses fatores de decapacitação se ligam à superfície espermática, ativem a bomba de extrusão de íons cálcio (Ca^{2+}) que mantém constante a concentração intracelular desse íon. A remoção desses fatores implica, portanto, no aumento da concentração intracelular do Ca^{2+} (Baldi *et al.*, 2000) que estimula a ATPase e adenilil ciclase, duas enzimas chaves que participam de diversas cascatas de sinalização durante os estágios finais da capacitação na tuba uterina (Tulsiani & Abou-Haila, 2012).

A pequena abertura na junção útero-tubária, que corresponde ao segundo local de seleção espermática, se constitui como uma barreira à entrada dos espermatozoides na tuba, sendo que a entrada bem-sucedida exige motilidade espermática ativa (Eisenbach & Giojalas, 2006; Ortega-Ferrusola *et al.*, 2017). O número de espermatozoides que entram na tuba uterina é notavelmente constante, em humanos, apenas cerca de 10% dos espermatozoides que estavam presentes no útero (Eisenbach & Giojalas, 2006; Ortega-Ferrusola *et al.*, 2017).

A tuba uterina apresenta duas regiões: o istmo e a ampola (Figura 9), cada uma com características anatômicas e fisiológicas distintas. Os espermatozoides que entram no istmo se ligam fortemente ao epitélio da tuba e ficam presos, formando um reservatório. É durante esse período em que permanecem aderidos ao epitélio que os espermatozoides sofrem a capacitação espermática final (Eisenbach & Giojalas, 2006) que inclui alterações de constituintes iônicos e mudanças na composição e organização lipídica bem como nas propriedades e no potencial da membrana plasmática (Baldi *et al.*, 2000; Florman & Fissore, 2015). Essas alterações, que acontecem tanto na cabeça como na cauda do espermatozoide, culminam na hiperativação da motilidade e tornam essas células responsivas a estímulos quimioatrativos e que induzem a reação acrossômica (Florman & Fissore, 2015; Molina *et al.*, 2018). Diversos estudos evidenciam que tanto o Ca^{2+} como o ânion bicarbonato (HCO_3^-) e a

adenosina 3', 5'-monofosfato cíclico (cAMP) são as principais moléculas na regulação desse processo (Tulsiani & Abou-Haila, 2012).

A albumina, a principal proteína presente nas secreções reprodutivas femininas, facilita a capacitação pelo efluxo de esteróis, principalmente o colesterol, da membrana plasmática dos espermatozoides. Essa remoção do colesterol desestabiliza a bi-camada lipídica da membrana plasmática e a torna mais fluídica (Tulsiani & Abou-Haila, 2012), o que possibilita a reação acrossômica e subsequente fusão do espermatozoide com o ovócito (Cooper & Yeung, 2010). Além do efluxo de colesterol, também acontece fosforilação de resíduos de tirosina de um subconjunto de proteínas presentes na cauda o que viabiliza a aquisição da motilidade hiperativada (Tulsiani & Abou-Haila, 2012). A hiperativação envolve uma transição do padrão de batimento simétrico e de baixa amplitude, típico de células progressivamente móveis, para um padrão assimétrico e de alta amplitude nos espermatozoides ativados (Aitken & Nixon, 2013).

Devido à sua menor afinidade pelo epitélio, os espermatozoides que se tornam capacitados são liberados do local de armazenamento e requerem orientação quimiotática e termostática para chegar até o ovócito no local da fertilização (Eisenbach & Giojalas, 2006).

O PROCESSO DE FERTILIZAÇÃO

O processo de fertilização é uma sequência de eventos coordenados que envolvem a fusão do espermatozoide com o ovócito, fusão dos pró-núcleos e mistura dos cromossomos maternos e paternos dando início ao desenvolvimento de um novo indivíduo (Primakoff & Myles, 2002). Após atingir a ampola, local de fertilização, os espermatozoides ainda precisam superar dois investimentos do ovócito que potencialmente impedem o contato direto com a membrana plasmática: a corona radiata, uma camada de células da granulosa incorporadas em uma matriz viscoelástica composta principalmente por ácido hialurônico e a zona pelúcida, uma matriz extracelular composta por glicoproteínas denominadas ZP1, ZP2, ZP3 e ZP4/B, sendo que a ZP3 e, possivelmente, a ZP4/B estão envolvidas na ligação do espermatozoide à zona pelúcida enquanto a ZP1 e ZP2 fornecem integridade estrutural a esse investimento (Nixon *et al.*, 2007; Cooper & Yeung, 2010).

Somente espermatozoides com o acrossomo intacto conseguem penetrar na corona radiata e para transpor essa primeira barreira utilizam a motilidade hiperativada e uma hialuronidase de superfície denominada PH-20. Uma vez vencida essa primeira barreira os

espermatozoides entram em contato com a zona pelúcida e se ligam as proteínas ZP3 o que desencadeia aumento do Ca^{2+} e do pH intracelular, da fosforilação de cAMP e da proteína tirosina que culminam em processos complexos de transdução de sinal e acarretam na fusão da membrana plasmática com a membrana acrossomal externa subjacente e a consequente exocitose de proteases acrossomais solúveis como a acrosina, processo denominado de reação acrossômica (Figura 11) (Primakoff & Myles, 2002; Cooper & Yeung, 2010).

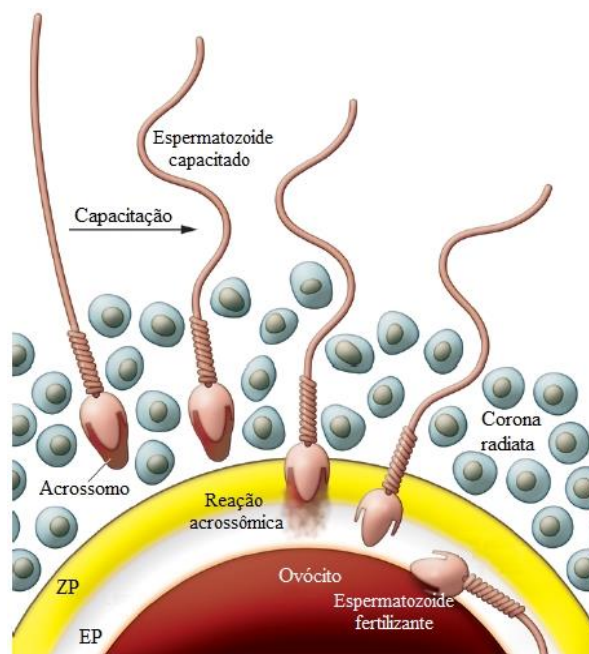


Figura 11. Mecanismos da interação espermatozoide-ovócito. (ZP = zona pelúcida e EP = espaço perivitelino).

Fonte: Adaptado de Ikawa *et al.*, 2010.

Esse processo acontece apenas na região acrossomal anterior, portanto, a região posterior que compreende o segmento equatorial permanece intacta e é considerada o local de contato inicial entre o espermatozoide e o ovócito (Cooper & Yeung, 2010). Uma vez dentro do espaço perivitelino, área entre zona pelúcida e a membrana plasmática, a região equatorial e pós acrossomal da cabeça do espermatozoide se ligam à membrana plasmática do ovócito e a interação de integrinas presentes na membrana plasmática do ovócito com desintegrinas, especificamente a fertilina α e β e a cirtestina (Nixon *et al.*, 2007) bem como a proteína Izumo presentes na membrana plasmática dos espermatozoides resultam na fusão das membranas dos gametas (Figura 11) (Cooper & Yeung, 2010).

A fusão espermatozoide-ovócito resulta na ativação do ovócito pelo fator de ativação de ovócito associado ao espermatozoide. Esse fator estimula a liberação de Ca^{2+} intracelular no ovócito que através de uma cascata de sinalização induz a degradação de certos inibidores, responsáveis pela parada do ovócito na meiose II, de modo que o ovócito prossegue na meiose. A extrusão subsequente do segundo corpúsculo polar é a evidência da conclusão da meiose, até então, interrompida (Cooper & Yeung, 2010). A ativação do ovócito promove a fusão de vesículas contendo grânulos corticais, que estão superficialmente situados no ovócito não fertilizado, com a membrana plasmática o que altera imediatamente a sua composição e perda de afinidade pelos espermatozoides. Além disso, com a fusão ocorre a liberação do conteúdo dos grânulos corticais para o espaço perivitelino o que promove a alteração da ZP3. Estes dois eventos constituem o bloqueio a poliespermia. Após algumas horas da fusão, protaminas presentes na cromatina do espermatozoide são substituídas por histonas, os grupos metil são removidos do DNA e o pronúcleo masculino é formado (Cooper & Yeung, 2010).

A entrada do espermatozoide além de ativar o ovócito que progride na meiose e forma o pronúcleo feminino, também ativa o centrômero do espermatozoide fertilizante que é responsável por organizar os fusos de microtúbulos necessários para a união dos pronúcleos masculino e feminino. Ambos os pronúcleos se movem juntos e os cromossomos se condensam durante a prófase da singamia, antes da quebra da membrana nuclear, momento em que os conjuntos de cromossomos paterno e materno se tornam visíveis (Cooper & Yeung, 2010).

A infertilidade pode estar associada a diversos eventos necessários para a fertilização, seja durante a formação, maturação ou capacitação dos espermatozoides (Cooper & Yeung, 2010), portanto, é de extrema importância compreender aspectos fisiológicos do gameta masculino (Amaral *et al.*, 2014) e o estudo de componentes a nível molecular pode decifrar vias metabólicas essenciais para o diagnóstico da infertilidade masculina (du Plessis *et al.*, 2011). Assim, o uso de técnicas de genética, proteômica e metabolômica podem ser a chave para prognóstico e tratamento mais precisos da infertilidade e é dentro dessas categorias que a busca de potenciais biomarcadores pode começar (Kovac *et al.*, 2013).

PROTEÔMICA E BIOMARCADORES DE FERTILIDADE

O espermatozoide humano é particularmente receptivo a estudos proteômicos, já que é uma célula acessível que pode ser facilmente purificada e analisada. A proteômica pode

confirmar a presença e concentração de proteínas bem como detectar formas ativadas, fosforiladas, ubiquitinadas, metiladas, acetiladas, glicosiladas, oxidadas e/ou nitrosiladas. Logo, é fácil entender como a proteômica pode ser uma ferramenta poderosa na identificação de potenciais biomarcadores, que no contexto da infertilidade masculina, têm a intenção de avaliar, de forma precisa e minimamente invasiva o potencial de um homem para a paternidade (Kovac *et al.*, 2013).

Revisões recentes destacam que diversas proteínas tanto espermáticas como do plasma seminal poderiam atuar como potenciais biomarcadores, como exemplos: a proteína de choque térmico 2 – *heat shock protein 2* (HSPA2) presente no acrossomo e descrita por Redgrove *et al.* (2012) está associada ao comprometimento da ligação do espermatozoide com o ovócito, do mesmo modo a SAMP32 descrita por Hao *et al.* (2002), também presente no acrossomo, possui relevância na fusão espermatozoide-ovócito. A proteína indutível pela prolactina – *prolactina inducible protein* (PIP), presente no plasma seminal, apresenta concentração aumentada em homens azoospermicos e, recentemente, foi descoberto que interage e forma complexos com a albumina de soro humano – *human serum albumin* (HSA). A HSA, uma proteína abundante do plasma seminal, desempenha papel na capacitação e motilidade dos espermatozoides. Como tal, é tentador especular que a PIP, HAS e/ou complexo PIP/HAS possam atuar como biomarcadores (Kumar *et al.*, 2012).

PROTEÍNA ESPERMÁTICA SP22

Diversas proteínas espermáticas, bem como do fluido epididimário e plasma seminal têm sido associadas com a fertilidade e, nos últimos anos, diversos pesquisadores vêm apresentando, considerável esforço, com o intuito de identificar e caracterizar essas proteínas (Klinefelter & Welch, 1999). Assim, Klinefelter iniciou a difícil tarefa de reconhecer uma proteína espermática que pudesse servir como um biomarcador mais sensível da capacidade de fertilização do que a concentração, motilidade ou morfologia espermáticas (Klinefelter, 2008). E, foi em 1997, através de um estudo, conduzido em ratos, com 4 toxicantes epididimários, o etano dimetanosulfonato, cloroetilmetanosulfonato, epicloridrina e hidroxiflutamida, que Klinefelter *et al.* constataram que ao correlacionar a fertilidade com 120 proteínas individuais da membrana plasmática do espermatozoide, apenas uma era significativamente diminuída e apresentava concentração altamente correlacionada ($r^2 = 0,83$) com a fertilidade desses gametas. Essa proteína que apresenta ponto isoelétrico (PI) de 5,5 e

massa molecular de 22 kDa em gel de acrilamida a 11% foi denominada de proteína espermática SP22 (*sperm protein* – 22kDa).

A partir dessa descoberta diversos estudos foram realizados tanto para caracterizar a molécula da SP22 como para identificar a função da nova proteína (Klinefelter, 2008). Através do sequenciamento dos aminoácidos Welch *et al.* (1998), revelaram que a SP22 é constituída por 5 sequências peptídicas idênticas a uma proteína associada à contracepção 1 - *contraception associated protein 1* (CAP1) descrita, em ratos, por Wagenfeld *et al.* (1998) e com 90% de homologia, diferindo apenas em 10 substituições de aminoácidos, a uma proteína humana designada DJ-1 (Nagakubo *et al.*, 1997), RS (Hod *et al.*, 1999) e mais recentemente PARK7 (Bonifati *et al.*, 2003) (Figura 11). Ainda com base no sequenciamento dos aminoácidos, mostraram que a SP22 é membro de uma família de genes altamente conservados, até então, nunca descritos no campo da biologia reprodutiva, e amplamente expressos em diferentes espécies (Welch *et al.*, 1998) como equinos, bovinos, aves e ser humano (Klinefelter *et al.*, 2002) bem como em diferentes órgãos entre eles coração, cérebro, fígado, próstata, testículo, glândula seminal e epidídimo (Welch *et al.*, 1998).

SP22/CAP1	1	MASKRALVILAKGAEEMETVIPVDIMRRAGIKVTVAGLAGKD..PVQCSRDV	50
DJ-1/RS/Park7	1	MASKRALVILAKGAEEMETVIPVDVMRRAGIKVTVAGLAGKD..PVQCSRDV	50
SP22/CAP1	51	VICPDTSLEEAKTQGPYDVVVLPGGNLGAQNLSESALVKEILKEQENRKG	100
DJ-1/RS/Park7	51	VICPDASLEDARKEGPYDVVVLPGGNLGAQNLSESAVKEILKEQENRKG	100
SP22/CAP1	101	LIAAICAGP.TALLAHEVGFGCKVTSHPLAKDKMMNGSHYSYSESERVEKD	149
DJ-1/RS/Park7	101	LIAAICAGP.TALLAHEIGCGSKVTTHPLAKDKMMNGGHYTYSENERVEKD	149
SP22/CAP1	150	GLI..LTSRGPGTSFEFALAIVEALSGKDMANQVLAPLVLKD	189
DJ-1/RS/Park7	150	GLI..LTSRGPGTSFEFALAIVEALNGKEVAAQVKAPLVLKD	189

Figura 11. Homologia da sequência de aminoácidos entre a SP22/CAP1 e a proteína humana PARK7.

Fonte: Klinefelter, 2008.

O gene da SP22 possui 3 sequências de DNA complementares (cDNAs), SP22A, SP22B e SP22C, sendo que a SP22A e SP22B são análogas e codificam 189 aminoácidos enquanto a SP22C codifica pelo menos 13 aminoácidos adicionais na região amino terminal. A SP22A e SP22B refletem a SP22 e apesar das regiões codificadoras dessas sequências de cDNAs serem as mesmas, a região 5' não traduzida – *untranslated region* (UTR) são diferentes. Logo, dois transcritos de RNA mensageiro (mRNA) com diferentes comprimentos da região 5' UTR são originados, um com 1.0 Kb e outro com 1.5 Kb (Welch *et al.*, 1998). A SP22C representa proteínas com o mesmo peso molecular da SP22, mas com PIs ligeiramente diferentes. Essas proteínas podem denotar variantes da SP22 ou, possivelmente, proteínas provenientes de mRNAs que são processados alternativamente.

Klinefelter & Welch (1999) mostraram que o transcrito com a região 5' UTR menor é encontrado tanto em tecidos somáticos como em tecidos reprodutivos e corresponde a SP22B. Enquanto o transcrito com a região 5' UTR maior é exclusiva do testículo e representa a SP22A. A transcrição dos mRNAs de 1.0 Kb tem início no princípio da espermatogênese enquanto os de 1.5 Kb surgem no momento da formação dos espermátócitos paquítenos e ambos aumentam sua expressão à medida que o desenvolvimento espermatogênico prossegue (Figura 12) (Klinefelter & Welch, 1999).

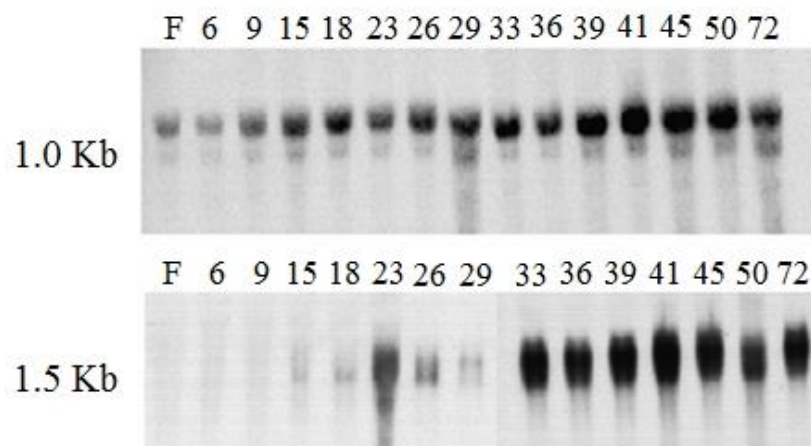


Figura 12. Northern blots de fígado (F) e testículo, de ratos, durante o desenvolvimento pós-natal (dia) utilizando sondas específicas para região 5' não traduzida.

Fonte: Adaptado de Klinefelter, 2008.

Além da expressão dos cDNAs da SP22 no testículo, a avaliação de proteínas em extratos de espermatozoides coletados da rete testis, após 18 horas da ligação dos ductos

eferentes, e análises de imunolocalização, utilizando anticorpo peptídico purificado por afinidade anti-SP22, produzido a partir de 4 das 5 sequências peptídicas da SP22, forneceram dados adicionais da origem testicular desta proteína (Klinefelter & Welch, 1999).

Klinefelter *et al.* (2002), através de análises de imunohistoquímica de testículo e epidídimo e imunocitoquímica de espermatozoides recuperados da rete testis e da cauda epididimária de rato, revelaram que a SP22 está presente no citoplasma e na base da cabeça de espermátides redondas e na cabeça e cauda de espermátides em alongamento e alongadas bem como na gota citoplasmática, sendo que durante a maturação no epidídimo é redistribuída e adquire sua localização característica no segmento equatorial da cabeça. Essa localização é similar entre as diversas espécies em que já foi estudada, incluindo o homem. Apesar dos mecanismos que levam a essas modificações na localização da SP22, durante o desenvolvimento das células germinativas e maturação espermática ainda serem desconhecidos (Welch *et al.*, 1998), suspeitas apontam para modificação pós-traducional. Suposições da estrutura secundária da SP22 indicam 3 regiões com conformação alfa-hélice putativa sem hidrofobicidade suficiente para ser reconhecida como um domínio transmembrana típico. É possível que a associação da SP22 com a membrana espermática seja mediada pela adição covalente de sete porções lipídicas, já que sete locais de N-miristoilação estão presentes na sequência da SP22, o que pode permitir a adição de ácidos mirísticos. Dois locais de glicosilação ligados a asparagina também estão presentes, mas não está claro se a glicosilação realmente pode ocorrer nesta proteína. Embora essas modificações pós-traducionais precisem ser confirmadas experimentalmente, elas poderiam fornecer um meio de modular tanto a localização quanto a função da proteína espermática SP22 (Klinefelter & Welch, 1999).

A forte associação entre as concentrações da SP22 e a fertilidade resultante dos gametas, em conjunto com a sua localização no segmento equatorial da cabeça dos espermatozoides, sugerem que essa proteína desempenhe papel crucial no processo de fertilização. E de fato, Klinefelter *et al.* (2002) demonstraram que anticorpos produzidos contra a SP22 inibem a interação com o ovócito e/ou capacidade de fertilização *in vitro* ou *in vivo*.

Embora muitas proteínas espermáticas sejam supostamente essenciais para a fertilidade masculina (Tabela 3), até o momento, nenhum trabalho demonstrou suas modulações após insulto tóxico ao testículo ou epidídimo, assim, o papel dessas proteínas como biomarcador

permanece incerto. Sendo, portanto, a SP22 a única, demonstrada em diversos estudos, como um biomarcador consistente de efeito, isto é, na fertilidade (Klinefelter, 2008).

Tabela 3. Proteínas, identificadas nos últimos 20 anos, consideradas essenciais para a fertilidade masculina.

Proteína	Autor
LDHC4	Golderg <i>et al.</i> , 1986
D/E or Crisp-1	Brooks <i>et al.</i> , 1986; Roberts <i>et al.</i> , 2003; Ellerman <i>et al.</i> , 2006
PH-20	Primakoff <i>et al.</i> , 1988
SP-10	Herr <i>et al.</i> , 1990
FA-1; YLP12	Naz 1996; Naz 2004
P34H; P26H	Boue <i>et al.</i> , 1996; Gaudreault <i>et al.</i> , 2002
HE6	Osterhoff <i>et al.</i> , 1997
Fertilina B ou ADAM2	Zhu <i>et al.</i> , 2000
HE2	Hamil <i>et al.</i> , 2000
HE5 ou CD52	Yeung <i>et al.</i> , 2001
Prosaposin ou UPSEBP	Hammerstedt <i>et al.</i> , 2001
CatSper 1 & 2	Ren <i>et al.</i> , 2001; Quill <i>et al.</i> , 2003
GAPDS	Miki <i>et al.</i> , 2004
Eppin	O’Rand <i>et al.</i> , 2004

Fonte: Adaptado de Klinefelter, 2008.

Justificativa e Objetivos

Diversos estudos têm demonstrado que a concentração da proteína de membrana espermática SP22 é altamente correlacionada com a fertilidade em várias espécies e, portanto, tem sido estabelecida como biomarcador de fertilidade masculina. Diante dos altos índices de infertilidade por fator masculino que permanecem como idiopáticos, a utilização de um biomarcador mais sensível da capacidade reprodutiva pode fornecer um diagnóstico e tratamento mais precisos. Este trabalho é o primeiro que visa correlacionar diversos parâmetros de qualidade seminal de homens férteis e inférteis com a concentração da SP22, a fim de obter dados qualitativos e quantitativos que possam incorporar este potencial biomarcador em estudos clínicos e epidemiológicos.

Assim, o presente estudo teve por objetivos, a partir de amostras seminais humanas, padronizar a técnica de quantificação e imunolocalização da proteína de membrana espermática SP22 e investigar possíveis correlações entre parâmetros seminais convencionais e funcionais com a concentração dessa proteína, em homens férteis e inférteis, bem como avaliar o seu potencial como um biomarcador, não invasivo, preditivo de fertilidade/infertilidade.

Material e Métodos

GRUPO DE ESTUDO

Amostras seminais foram avaliadas através de 2 estudos observacionais: um do tipo caso-controle, onde indivíduos portadores de uma patologia são identificados e comparados com indivíduos controles ou referências, ou seja, que não apresentam a patologia, e outro do tipo seccional, onde se examina a prevalência de desfechos de saúde em uma população em determinado tempo ou em um período curto de tempo. Para ambos os estudos os critérios para a inclusão dos indivíduos foram homens entre 20 e 50 anos de idade, ausência de intervenções médicas como vasectomia e parceira sem fatores que interferem na fertilidade como a endometriose ou infertilidade já comprovada.

Para o estudo caso-controle foram entrevistados 110 homens da cidade de Botucatu e região e destes 44 foram incluídos no estudo. Esses voluntários foram agrupados de acordo com a fertilidade: férteis ($n = 17$) e inférteis ($n = 27$) (Figura 1). Já para o estudo seccional foram entrevistados 93 pacientes, atendidos pelo Centro de Reprodução Humana do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP, e destes 12 foram incluídos no estudo (Figura 1).

Os protocolos utilizados foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP (número do parecer: 1.228.614) e os indivíduos incluídos forneceram consentimento por escrito.

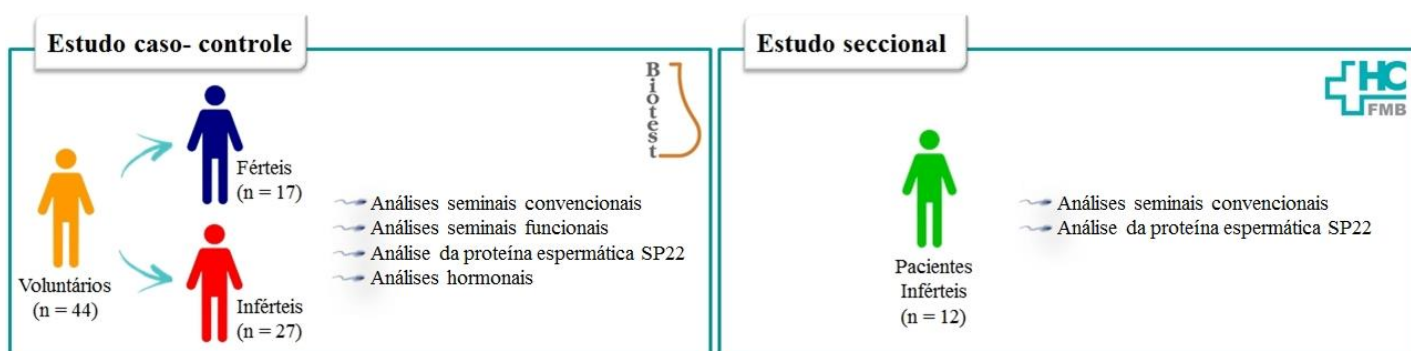


Figura 1. Design experimental.

COLETA E AVALIAÇÃO DAS AMOSTRAS

Amostras Seminais

Análises Seminais Convencionais

As amostras dos voluntários foram coletadas e analisadas no Biotest, um laboratório particular de análises clínicas, e as amostras dos pacientes coletadas e analisadas no Centro de Reprodução Humana do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP.

As amostras de sêmen obtidas por masturbação após 4 dias de abstinência ejacutória foram analisadas imediatamente após a liquefação, aproximadamente 30 minutos, de acordo com os critérios da WHO (2010). Conforme a motilidade apresentada, os espermatozoides foram classificados em: motilidade progressiva rápida (Tipo A), motilidade progressiva lenta (Tipo B), motilidade não progressiva (Tipo C), imóveis (tipo D) e motilidade total (tipo A + B). A morfologia espermática dos voluntários foi avaliada utilizando princípios da WHO com ponto de corte de 30% para espermatozoides normais e a dos pacientes através dos critérios descritos por Kruger *et al.* (1986).

Seleção dos Espermatozoides

Os espermatozoides foram selecionados através de adaptações da técnica de *swim-up* para a padronização e análises seminais funcionais pela técnica de citometria de fluxo, extração das proteínas de membrana e ensaio de imunocitoquímica. Resumidamente, o ejaculado total foi dividido em alíquotas de 1 mL que foram depositadas, cautelosamente, no fundo de tubos cônicos de 15 mL contendo 1 mL do tampão de isolamento de espermatozoides - *sperm isolation buffer* (SIB) (95 mL Hanks Balanced Salts Solution, 0,35g NaHCO₃, 4,2g HEPES, 0,9g glicose, 10 mL piruvato de sódio). Estes tubos foram inclinados à 45° e incubados à 37°C. Após 1 hora, o tampão contendo os espermatozoides móveis foi cautelosamente aspirado e uma alíquota utilizada para determinar a concentração espermática na câmara de Neubauer.

Padronização das Análises Seminais Funcionais por Citometria de Fluxo

Alíquotas de sêmen selecionado foram divididas em T100 (sêmen fresco contendo 100% de células de vivas) e T0 (sêmen *flash-frozen* contendo 100% de células mortas). Para indução da lesão total das membranas plasmática e acrossomal, perda do potencial mitocondrial e alta

produção de ânion superóxido, a amostra *flash-frozen* foi submetida a 10 ciclos consecutivos de congelamento rápido em nitrogênio líquido (*flash-frozen*) e descongelamento em banho-maria à 46°C. Ao final desses 10 ciclos, uma alíquota do T0 foi misturada a uma alíquota do T100 na proporção de 1:1, o que originou a amostra T50 (sêmen fresco + sêmen *flash-frozen*) com aproximadamente 50% de espermatozoides vivos e 50% mortos.

Após a preparação das amostras seminais (T100, T50 e T0), uma alíquota de cada foi ressuspendida em PBS-0,5% BSA ou em meio TALP-PVA modificado segundo Parrish *et al.* (1988) (100mM NaCl, 3,1mM KCl, 25mM NaHCO₃, 0,3mM NaH₂PO₄, 21,6mM DL-lactato de sódio 60%, 2mM CaCl₂, 0,4mM MgCl₂, 10mM HEPES - livre de ácido, 1mM piruvato de sódio, 1 mg álcool polivinil - PVA e 25 µg/mL gentamicina) na concentração de 1×10^6 espermatozoides/mL e incubadas de acordo com os protocolos descritos a seguir.

Padronização dos Protocolos Multiparamétricos

Para a padronização dos protocolos foram utilizados dois citômetros: o BD LSR Fortessa (Becton Dickinson Corp. Franklin Lakes, NJ, EUA) equipado com laser azul (488nm, 100mW), vermelho (640nm, 40mW) e violeta (405nm) e o BD FACS Canto II (Becton Dickinson, CA, USA) equipado com laser azul (488nm, 20mW) e vermelho (633nm, 17mW).

Alíquotas das amostras T100, T50 e T0 foram utilizadas para as seguintes análises multiparamétricas: (1) integridade das membranas plasmática e acrossomal e (2) potencial mitocondrial, produção de ânion superóxido na matriz mitocondrial e estabilidade da membrana plasmática.

A autofluorescência e controles de cada fluorocromo foram adquiridos para ajuste de sobreposição de onda e compensação através da matriz de compensação do próprio software. Os dados foram gerados utilizando gráficos dot plot incluindo o eixo $< 0t$ (bi-exponencial) o que torna todos os eventos visíveis e adequadamente compensados.

Citômetro equipado com laser azul, vermelho e violeta

Para excitação em 488nm, os filtros de emissão utilizados foram 695/40nm (MitoSOXTM Red e iodeto de propídio) e 530/30nm (YO-PRO-1 e aglutinina de *Pisum sativum* conjugada ao isotiocianato de fluoresceína), para excitação em 640nm, o filtro de emissão foi 660/20nm (MitoStatusTM Red) e para excitação em 405nm, o filtro de emissão foi 450/50nm (Hoechst 33342).

A sonda Hoechst (H342), utilizada em citômetros equipados com laser violeta e ultravioleta, devido o seu comprimento de onda, possibilita uma separação mais eficiente da população alvo, já que mesmo após a seleção por tamanho e granulosidade ainda é possível notar a presença de debris celulares (Figura 2).

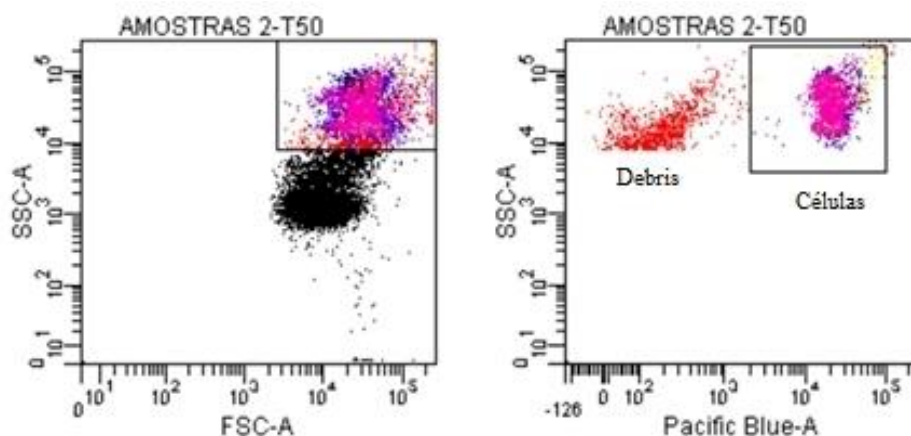


Figura 2. Gráfico dot plot representando a seleção de eventos (SSC-A x FSC-A) para posterior seleção das células espermáticas (Hoechst 33342 positivas) e exclusão de debris (SSC-A x Pacific-Blue-A).

Para a avaliação da integridade da membrana plasmática e acrossomal foi utilizado à associação de Hoechst 33342 (H342; marcação de DNA - 62249, ThermoFisher Scientific), iodeto de propídio (IP; marcação para célula com dano na membrana plasmática – P4170, Sigma-Aldrich) e aglutinina de *Pisum sativum* conjugada ao isotiocianato de fluoresceína (FITC-PSA; marcação para célula com dano no acrossomo – L0770, Sigma-Aldrich) de acordo com Freitas-Dell'Aqua (2012). Em resumo, alíquotas das amostras seminais T100, T50 e T0 diluídas em TALP-PVA foram incubadas com 7 μ M de H342, 1.5 μ M de IP e 2ng de FITC-PSA à 37°C por 15 min, ao abrigo da luz. Ao término deste período, 20.000 células por alíquota foram adquiridas e os dados avaliados pelo software BD FACSDiva™ v6.1 (Figura 3).

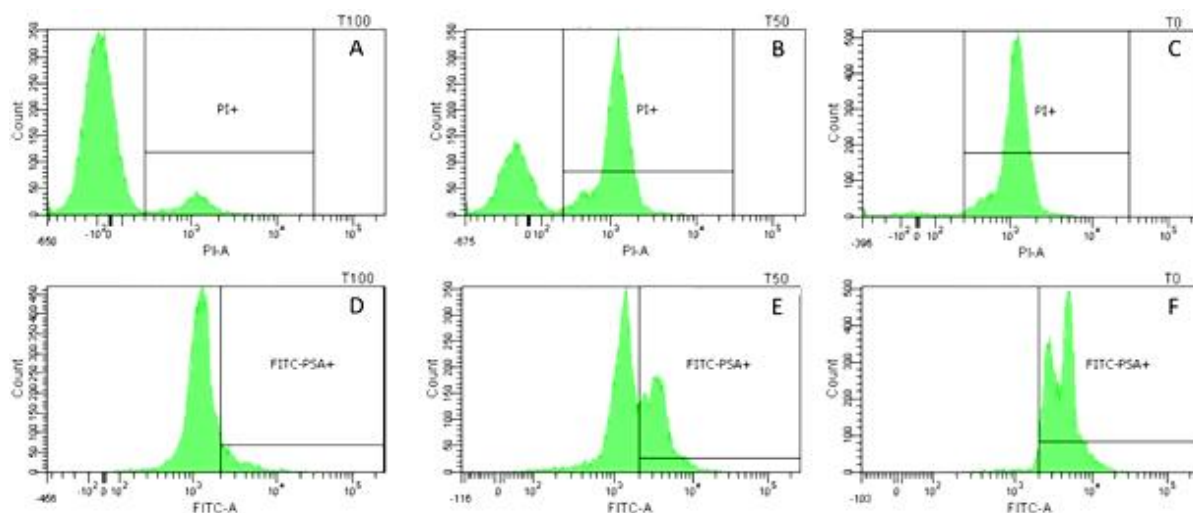


Figura 3. Histogramas representativos das análises dos protocolos de integridade de membranas plasmática e acrosssomal utilizando iodeto de propídio (PI) e FITC-PSA. A integridade da membrana plasmática (% de células positivas para PI) para as amostras T100 (15,5%), T50 (67,1%) e T0 (98,2%) são representadas pelos histogramas A-C, respectivamente e a integridade da membrana acrosssomal (% de células positivas para FITC-PSA) para as amostras T100 (10,7%), T50 (37,1%) e T0 (98,8%) são representadas pelos histogramas D-F, respectivamente.

Para avaliação do potencial mitocondrial, produção de ânion superóxido na matriz mitocondrial e estabilidade da membrana plasmática foi utilizada a associação de H342, MitoStatus Red (MST; potencial mitocondrial – 564697, BD Biosciences), MitoSOXTM Red (MS; geração de ânion superóxido na matriz mitocondrial – M36008, ThermoFisher Scientific) e YO-PRO-1 (YP; marcação para célula com membrana plasmática desestabilizada - Y3603, ThermoFisher Scientific) de acordo com Freitas-Dell'Aqua *et al.* (2018). Em resumo, alíquotas das amostras seminais T100, T50 e T0 diluídas em TALP-PVA foram incubadas com 7 μ M de H342, 20 μ M de MST, 2 μ M de MS e 25nM de YP à 37°C por 15 min, ao abrigo da luz. Ao término deste período, 20.000 células por alíquota foram adquiridas e os dados avaliados pelo software BD FACSDivaTM v6.1 (Figura 4).

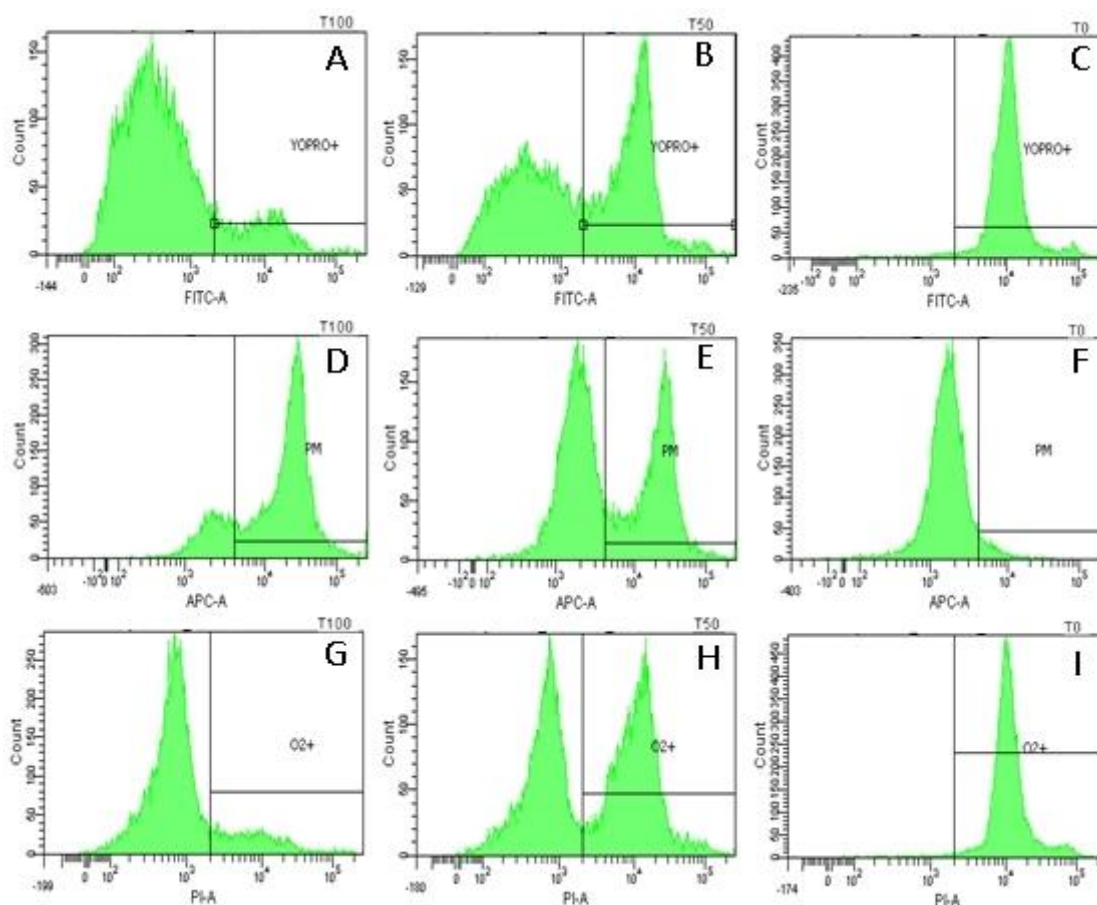


Figura 4. Histogramas representativos das análises dos protocolos de estabilização da membrana plasmática, potencial mitocondrial e produção de ânion superóxido na matriz mitocondrial utilizando YO-PRO-1, MitoStatus Red e MitoSox Red. A estabilização da membrana plasmática (% de células positivas para YO-PRO-1) para as amostras T100 (15,7%), T50 (57,3%) e T0 (98,8%) são representadas pelos histogramas A-C, respectivamente, o potencial mitocondrial (% de células com alta fluorescência de MitoStatus Red) para as amostras T100 (80,0%), T50 (46,0%) e T0 (5,4%) são representadas pelos histogramas D-F, respectivamente e a produção de ânion superóxido (% de células alta fluorescência de MitoSox Red) para as amostras T100 (16,7, %), T50 (52,8%) e T0 (98,3%) são representadas pelos histogramas G-I, respectivamente.

Citômetro equipado com laser azul e vermelho

Para excitação em 488nm, os filtros de emissão utilizados foram 695/40nm (MitoSOXTM Red e iodeto de propídio) e 530/30nm (YO-PRO-1 e FITC-PSA) e para excitação em 633nm, o filtro de emissão foi 660/20nm (MitoStatusTM Red).

Como esse equipamento não possui o laser capaz de excitar o fluorocromo Hoechst foi necessário preparar uma alíquota seminal sem a adição de fluorocromos T100-NM (sêmen fresco contendo 100% de células vivas e não marcadas) para a identificação da população alvo através da seleção por tamanho e granulidade (Figura 5).

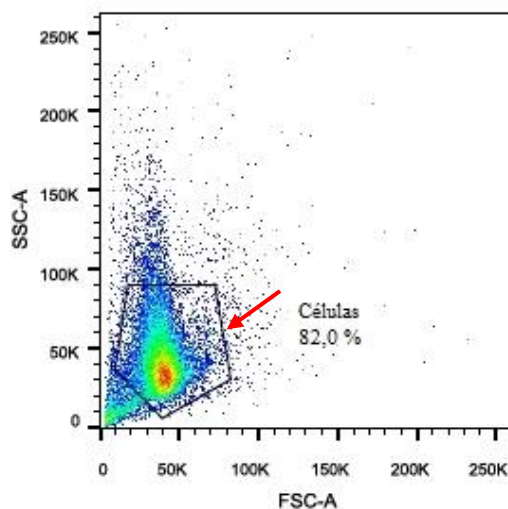


Figura 5. Gráfico dot plot da localização da população alvo. A seta aponta o *gate* que delimita as células vivas.

Para as 2 análises multiparamétricas, alíquotas T100-NM, T100, T50 e T0 foram diluídas em PBS-0,5% BSA. Foram utilizadas as mesmas associações e concentrações dos fluorocromos descritas acima, no entanto, sem a adição do H342 e com a incubação do FITC-PSA apenas nos últimos 5 min. Foram adquiridas 20.000 células por alíquota e os dados obtidos avaliados pelo software FlowJo® v10.

Análises Seminais Funcionais por Citometria de Fluxo

As análises seminais funcionais foram realizadas no citômetro equipado com os lasers azul e vermelho, sendo que apenas alíquotas T100-NM e T100 foram preparadas, incubadas, adquiridas e analisadas de acordo com o protocolo descrito acima.

Análises da Proteína Espermática SP22

Extração das Proteínas de Membrana

As proteínas de membrana dos espermatozoides foram extraídas de acordo com Klinefelter *et al.* (1997). Em resumo, os espermatozoides selecionados foram incubados com 1 mL de 80 mM n-octyl- β -glucopiranosídeo (OBG) em 10 mM de Tris, pH 7,2 contendo 1 μ L de 0,2 mM de fenilmetilsufonil fluoreto - *phenylmethanesulfonyl fluoride* (PMSF) (Sigma-Aldrich®) em metanol durante 1h. Após esse período, em temperatura ambiente, a amostra foi

centrifugada a 200×g por 10 min à 4°C e o sobrenadante, contendo as proteínas de membrana, foi removido e congelado a -80°C até o ensaio de proteínas.

Dessalinização, Concentração e Ensaio de Proteínas

Antes do ensaio de proteínas, as amostras foram descongeladas e cada extrato foi dessalinizado e lavado com Tris-HCl 1 mM, pH 7,2 através de 2 centrifugações a 6500×g por 10 min à 4°C em filtro de centrifugação Ultrafree-4 10 unidades (Millipore, Bedford, MA, EUA) para a sua concentração. Após a preparação curva padrão e do reagente BCA (Pierce *BCA Protein Assay Kit*, Thermo Fisher Scientific®), alíquotas da curva padrão, branco e amostras dessalinizadas e concentradas foram incubadas com o BCA por 1h à 60°C. Em seguida, 200 µL foram pipetados, em duplicata, em microplaca de 96 poços (Costar 3595, Corning Inc., Corning, NY), a absorbância lida a 495nm e os valores expressos em µg/µL. Um volume contendo 10 µg de proteínas de membrana foi liofilizado.

Quantificação da Proteína Espermática SP22 pelo Método de ELISA

O ensaio de ELISA para SP22 foi realizado como descrito por Kaydos *et al.* (2004) com modificações. Para tanto, foram utilizadas microplacas de cultura de 96 poços (Costar 3595, Corning Inc., Corning, NY). Uma curva padrão foi gerada utilizando diluições seriadas do antígeno purificado por afinidade. Os padrões de SP22 e os extratos de proteínas de membrana foram pipetados na microplaca, em duplicata, e incubados *overnight* à 4°C para maximizar a absorção. No dia seguinte, os antígenos não ligados foram removidos e a microplaca incubada com caseinato em DPBS por 1h à 37°C. Logo em seguida, foi incubado o anticorpo primário produzido em ovelhas anti-rSP22 na concentração de 1:1000 em DPBS-11% BSA durante 1h à 37°C. Após três lavagens com DPBS-1% BSA foi incubado o anticorpo secundário *anti-sheep* conjugado com peroxidase (Pierce Immunopure 31480, Rockford, IL) na concentração de 1:500 em DPBS-1% BSA durante 1 h à 37°C. Após 4 lavagens com DPBS-1% BSA foi adicionado ABTS (Pierce, # 37615) e permitido que a reação se desenvolvesse por 15 min. A absorvância foi lida utilizando o software FLUOstar Galaxy (BMG Labtechnologies Inc., Durham, NC) a 405 nm e os valores foram expressos como densidade óptica.

Imunolocalização da Proteína Espermática SP22

Para o ensaio de imunocitoquímica, 1×10^5 espermatozoides selecionados foram fixados em paraformaldeído 4% em Sorenson (V:V) à temperatura ambiente por 5 min, lavado para retirada do fixador e incubado com 250 μ L de SIB contendo o anticorpo primário monoclonal concentrado (gentilmente fornecido pelo Dr. Gary Klinefelter) por 4 h à temperatura ambiente. Após o período de incubação, foi centrifugado a $200 \times g$ por 15 min e o pellet ressuspensionado em 500 μ L de SIB contendo 5 μ L do anticorpo secundário *Donkey anti-mouse, Alexa fluor 488 conjugate* (ThermoFisher Scientific®) e incubado por 1 h à temperatura ambiente. Após este período, uma alíquota de 20 μ L foi colocada em uma lâmina, adicionado 1 gota de Fluoroshield por cima e coberta com lamínula. As imagens foram capturadas e analisadas por um microscópio de fluorescência (Olympus) equipado com uma câmera digital e programa Image-Pro Plus® (Versão 6.0, Media Cybernetics, Silver Spring, MD, EUA).

Amostras Sanguíneas

Amostras de sangue foram coletadas e analisadas no laboratório Biotest. O soro foi obtido através da centrifugação das amostras de sangue e a concentração sérica da testosterona livre, SHBG, LH e FSH foram determinadas por quimioluminescência.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todas as variáveis foram inicialmente analisadas através do teste de Shapiro-Wilk para determinar a variância de homogeneidade e dados de normalidade. Para a comparação dos dados referentes à idade, análises seminais convencionais e funcionais, concentração sérica de testosterona livre, SHBG, FSH, e LH e concentração da proteína espermática SP22 foram utilizados os testes estatísticos paramétricos de t de Student ou não-paramétricos de Mann-Whitney, de acordo com a característica de cada variável. A existência ou não de correlação entre parâmetros seminais quantitativos foi investigada pelo coeficiente de correlação de Pearson. Quando a associação entre os parâmetros foi positiva, foi realizada a análise de regressão linear. A regressão linear múltipla foi utilizada para determinar a relação entre SP22, integridade da membrana plasmática e morfologia normal. Já para a comparação dos dados da padronização dos protocolos multiparamétricos foi utilizado o teste paramétrico de análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de LSD de Fisher. Quando a associação entre os parâmetros foi positiva, foi realizada a análise de regressão linear. As análises foram

realizadas pelo software GraphPad InStat v6 e as diferenças consideradas estatisticamente significativas quando $P \leq 0,05$.

Resultados

PADRONIZAÇÃO DAS ANÁLISES SEMINAIS FUNCIONAIS POR CITOMETRIA DE FLUXO

Citômetro equipado com laser azul, vermelho e violeta

A porcentagem média de espermatozoides com integridade das membranas plasmática e acrossomal, estabilização da membrana plasmática, potencial mitocondrial e produção de ânion superóxido na matriz mitocondrial, mostradas na Tabela 1, foram significativamente diferentes entre as alíquotas T100, T50 e T0.

Tabela 1. Integridade das membranas plasmática e acrossomal, estabilidade da membrana plasmática, potencial mitocondrial e produção de ânion superóxido na matriz mitocondrial nas diferentes amostras, T100 (sêmen fresco), T50 (sêmen fresco + sêmen *flash-frozen*, V:V) e T0 (sêmen *flash-frozen*), avaliadas em citômetro equipado com 3 lasers.

Variáveis Analisadas	T100 (%)	T50 (%)	T0 (%)
Integridade da membrana plasmática (Iodeto de propídio+)	17,8 ± 2,9 ^c	58,1 ± 3,6 ^b	92,7 ± 2,3 ^a
Integridade da membrana acrossomal (FITC-PSA+)	13,14 ± 3,5 ^c	31,3 ± 3,9 ^b	70,1 ± 7,4 ^a
Estabilidade da membrana plasmática (YO-PRO-1+)	35,0 ± 6,7 ^c	65,6 ± 4,6 ^b	97,6 ± 7,2 ^a
Potencial mitocondrial (MitoStatus+)	66,2 ± 5,8 ^a	37,0 ± 2,9 ^b	14,9 ± 2,9 ^c
Produção de ânion superóxido (MitoSox+)	33,0 ± 4,7 ^c	64,8 ± 3,7 ^b	98,7 ± 0,2 ^a

Valores expressos como média ± E.P.M, P = 0,0001. Teste de ANOVA, T100, T50 e T0 (n = 7).

Como houve diferença estatística entre as alíquotas foram realizadas análises de regressão linear e os valores dos coeficientes de determinação foram próximos de 1: integridade da membrana plasmática ($R^2 = 0,9431$), integridade acrossomal ($R^2 = 0,7398$), estabilidade da membrana plasmática ($R^2 = 0,8310$), potencial mitocondrial ($R^2 = 0,8076$) e produção de ânion superóxido na matriz mitocondrial ($R^2 = 0,9071$) (Figura 1).

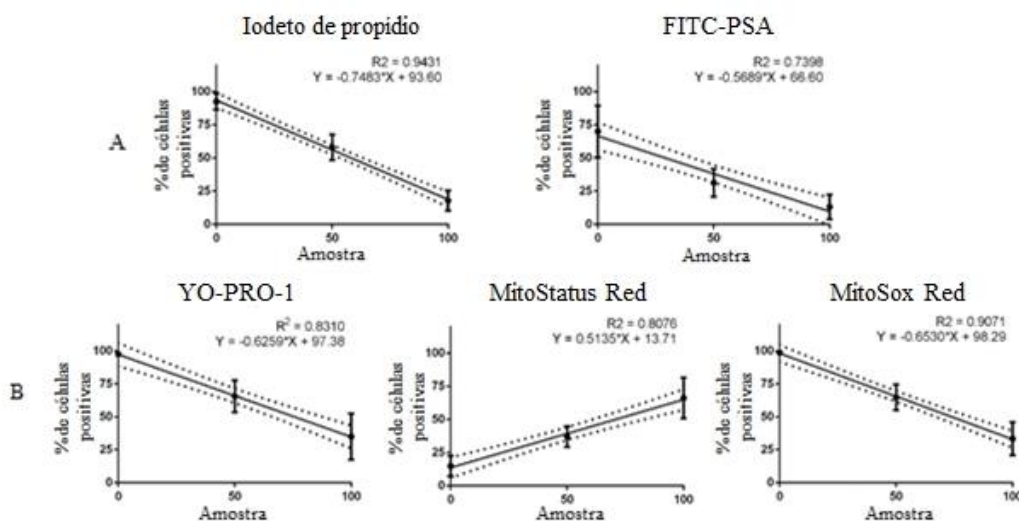


Figure 1. Regressão linear dos protocolos avaliados em citômetro equipado com 3 lasers: (A) associação de iodeto de propídio e FITC-PSA para integridade das membranas plasmática e acrossomal e (B) associação de YO-PRO-1, MitoStatus Red e MitoSox Red para estabilização da membrana plasmática, potencial mitocondrial e produção de ânion superóxido na matriz mitocondrial.

Citômetro equipado com laser azul e vermelho

A porcentagem média de espermatozoides com integridade das membranas plasmática e acrossomal, estabilização da membrana plasmática, potencial mitocondrial e produção de ânion superóxido foram significativamente diferentes entre as alíquotas T100, T50 e T0 (Tabela 2).

Tabela 2. Integridade das membranas plasmática e acrossomal, estabilidade da membrana plasmática, potencial mitocondrial e produção de ânion superóxido na matriz mitocondrial nas diferentes amostras, T100 (sêmen fresco), T50 (sêmen fresco + sêmen *flash-frozen*, V:V) e T0 (sêmen *flash-frozen*), avaliadas em citômetro equipado com 2 lasers.

Variáveis Analisadas	T100 (%)	T50 (%)	T0 (%)
Integridade da membrana plasmática (Iodeto de propídio+)	19,2 ± 5,0 ^c	46,7 ± 3,2 ^b	80,3 ± 5,4 ^a
Integridade da membrana acrossomal (FITC-PSA+)	9,5 ± 3,4 ^c	42,0 ± 7,0 ^b	64,1 ± 3,6 ^a
Estabilidade da membrana plasmática (YO-PRO-1+)	19,4 ± 4,5 ^c	43,0 ± 2,6 ^b	74,0 ± 5,4 ^a
Potencial mitocondrial (MitoStatus+)	62,1 ± 6,4 ^a	38,8 ± 3,2 ^b	10,5 ± 2,5 ^c
Produção de ânion superóxido (MitoSox+)	15,8 ± 2,4 ^c	42,8 ± 3,8 ^b	75,27 ± 5,8 ^a

Valores expressos como média ± E.P.M, P = 0,0001. Teste de ANOVA, T100, T50 e T0 (n = 7).

Como houve diferença entre as alíquotas foram realizadas análises de regressão linear e os valores dos coeficientes de determinação foram próximos de 1: integridade da membrana plasmática ($R^2 = 0,8501$), integridade acrossomal ($R^2 = 0,7946$), estabilidade da membrana plasmática ($R^2 = 0,8370$), potencial mitocondrial ($R^2 = 0,8211$) e produção de ânion superóxido ($R^2 = 0,8652$) (Figura 2).

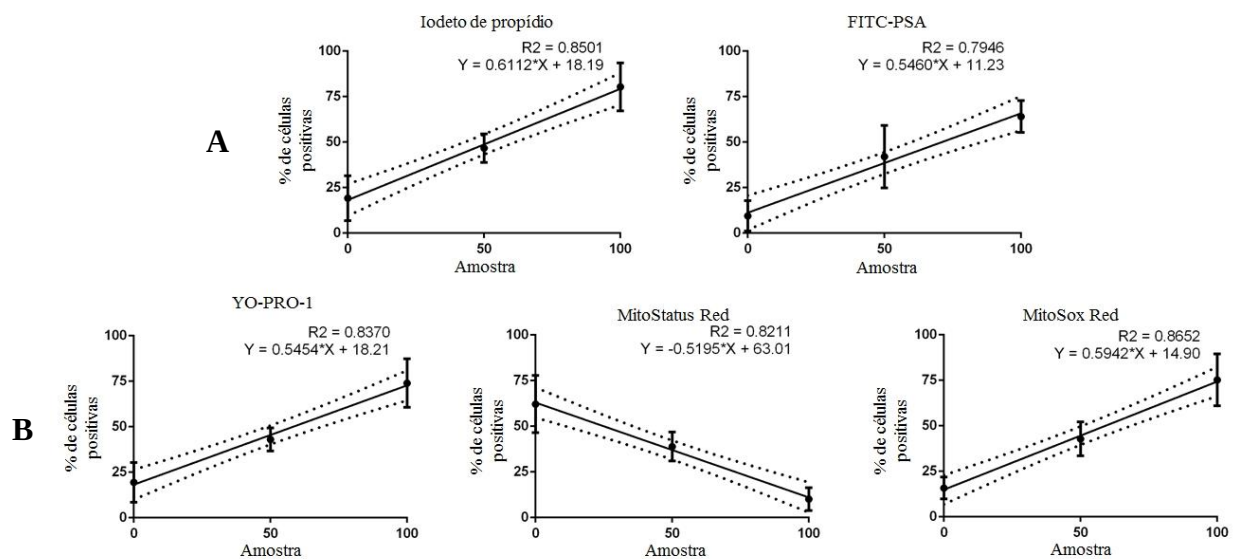


Figure 2. Regressão linear dos protocolos avaliados em citômetro equipado com 2 lasers: (A) associação de iodeto de propídio e FITC-PSA para integridade das membranas plasmática e acrossomal e (B) associação de YO-PRO-1, MitoStatus Red e MitoSox Red para estabilização da membrana plasmática, potencial mitocondrial e produção de ânion superóxido na matriz mitocondrial.

VOLUNTÁRIOS

Idade, Tempo de Infertilidade e Fecundidade

A idade dos voluntários foi semelhante entre os grupos experimentais (Figura 3), a média referente ao tempo de infertilidade dos voluntários inférteis de 3,44 anos e a taxa de fecundidade dos férteis de 1,59 filhos.

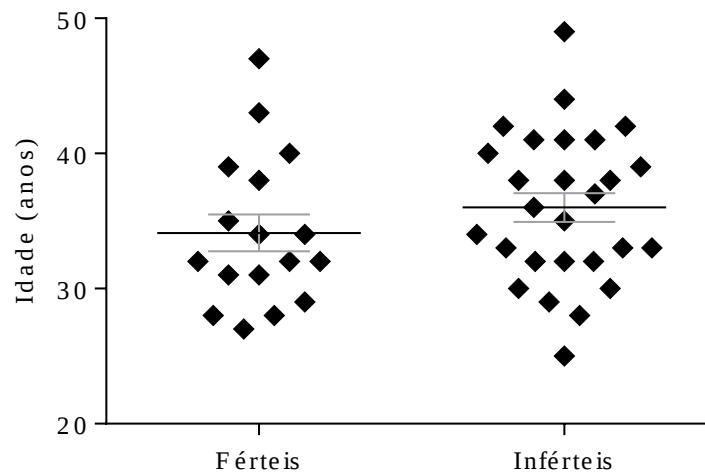


Figura 3. Idade dos voluntários.

Valores expressos como média $\pm$ E.P.M, $P > 0,05$. Teste t de Student, Férteis ($n = 17$) e Inférteis ($n = 27$).

Análises Seminais Convencionais

Os dados relativos ao volume, concentração espermática e número total de espermatozoides do ejaculado e pós *swim-up* são mostrados na Figura 4. Os voluntários inférteis apresentaram redução significativa tanto no volume ($p = 0,0068$) e número total de espermatozoides ($p = 0,0088$) ejaculados bem como no volume ($p = 0,0077$), concentração espermática ($p = 0,0090$) e número total de espermatozoides ($p = 0,0090$) pós-processamento. Já a concentração espermática do ejaculado não foi significativamente diferente quando comparada ao dos voluntários férteis.

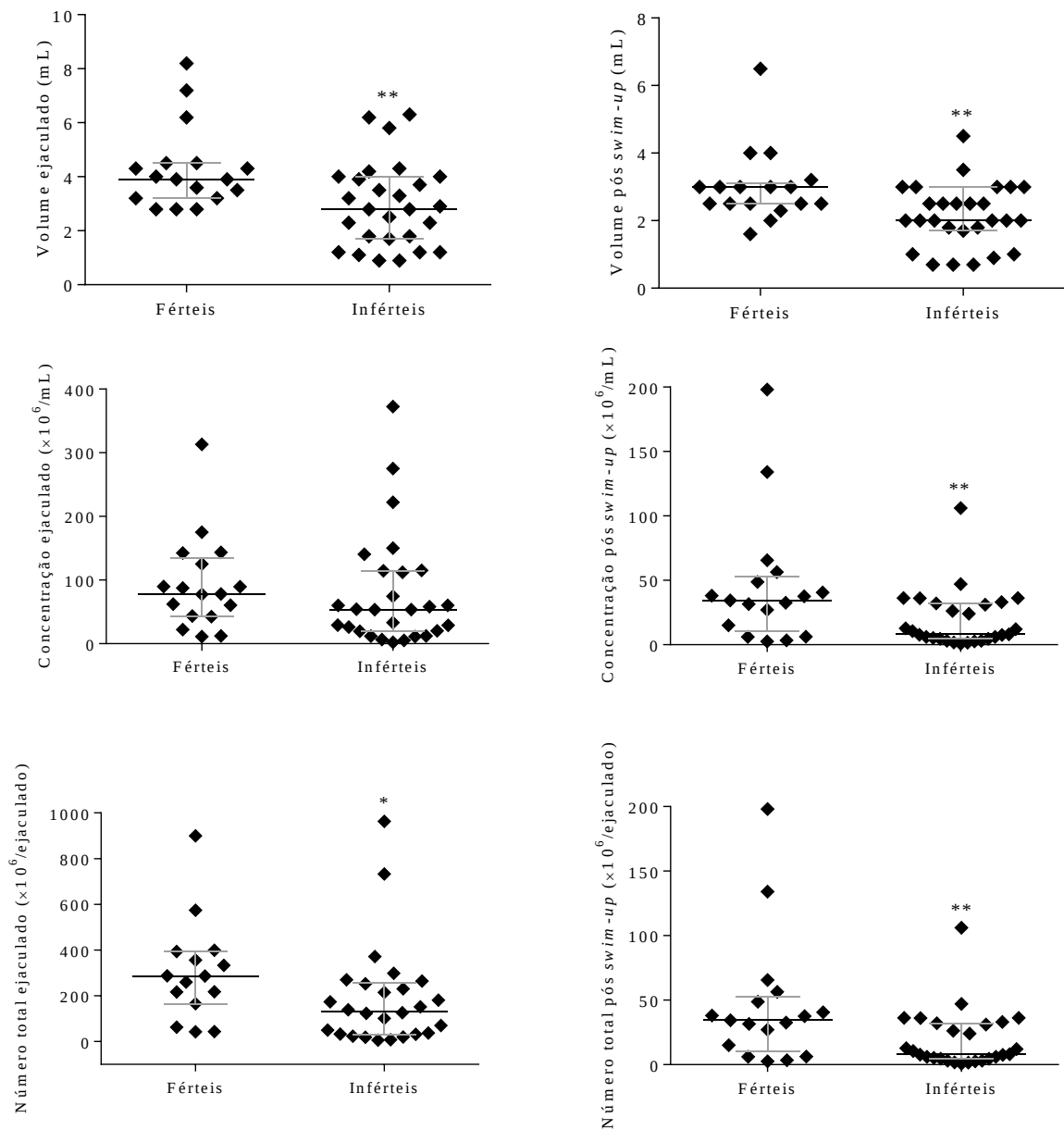


Figura 4. Volume, concentração espermática e número total de espermatozoides do ejaculado e pós swim-up.

Valores expressos como mediana (1ºquartil - 3ºquartil), ** $P \leq 0.0090$ e $P > 0.05$. Teste de Mann-Whitney, Férteis ($n = 17$) e Inférteis ($n = 27$).

A morfologia espermática revelou que o percentual de espermatozoides anormais foi significativamente maior nos voluntários inférteis (Figura 5).

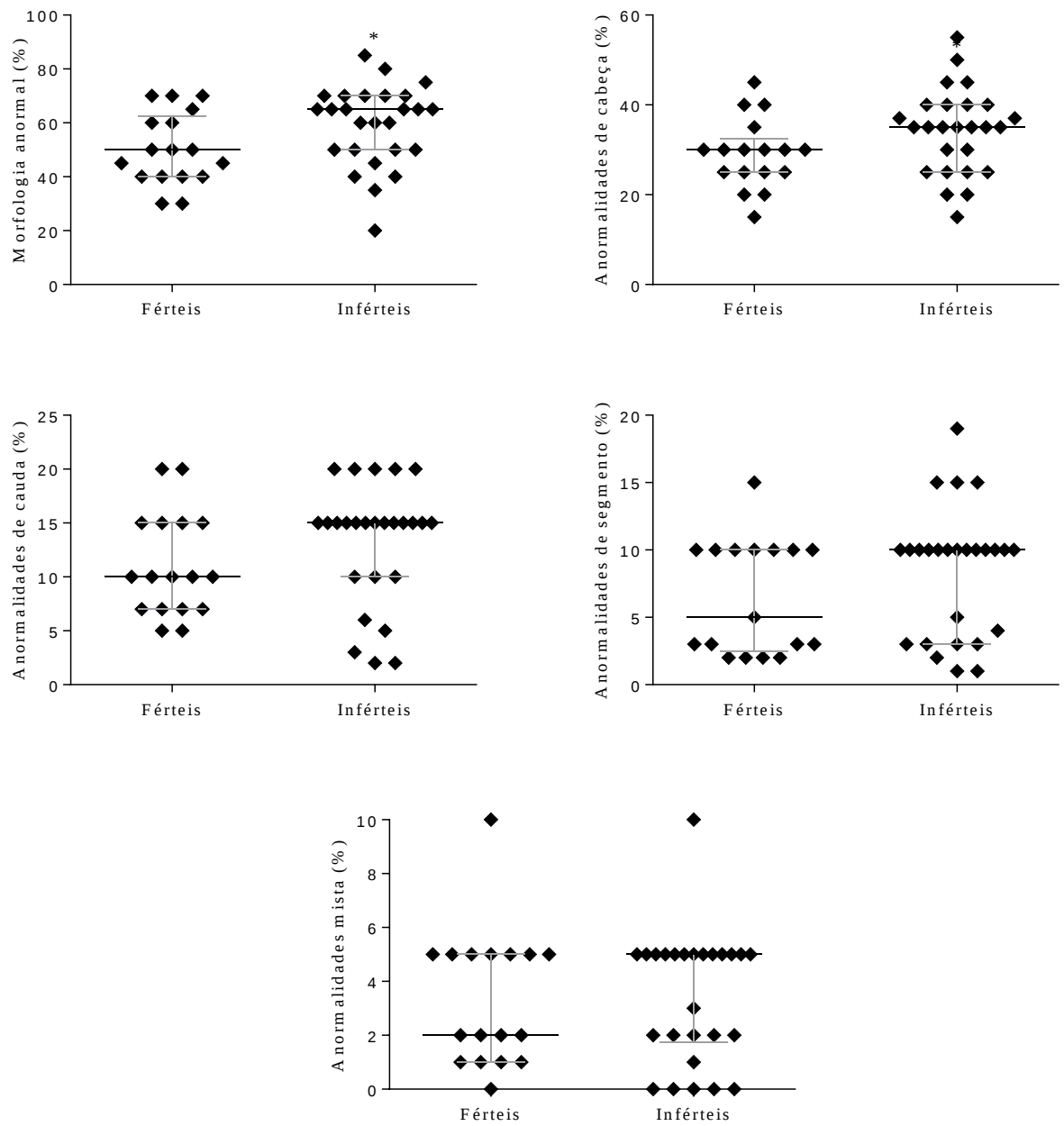


Figura 5. Morfologia espermática.

Valores expressos como mediana (1ºquartil - 3ºquartil), * $P \leq 0.05$. Teste de Mann-Whitney, Férteis (n = 17) e Inférteis (n = 26).

Com relação à motilidade em todos os tipos de movimentos, os voluntários inférteis foram comparáveis aos férteis (Figura 6).

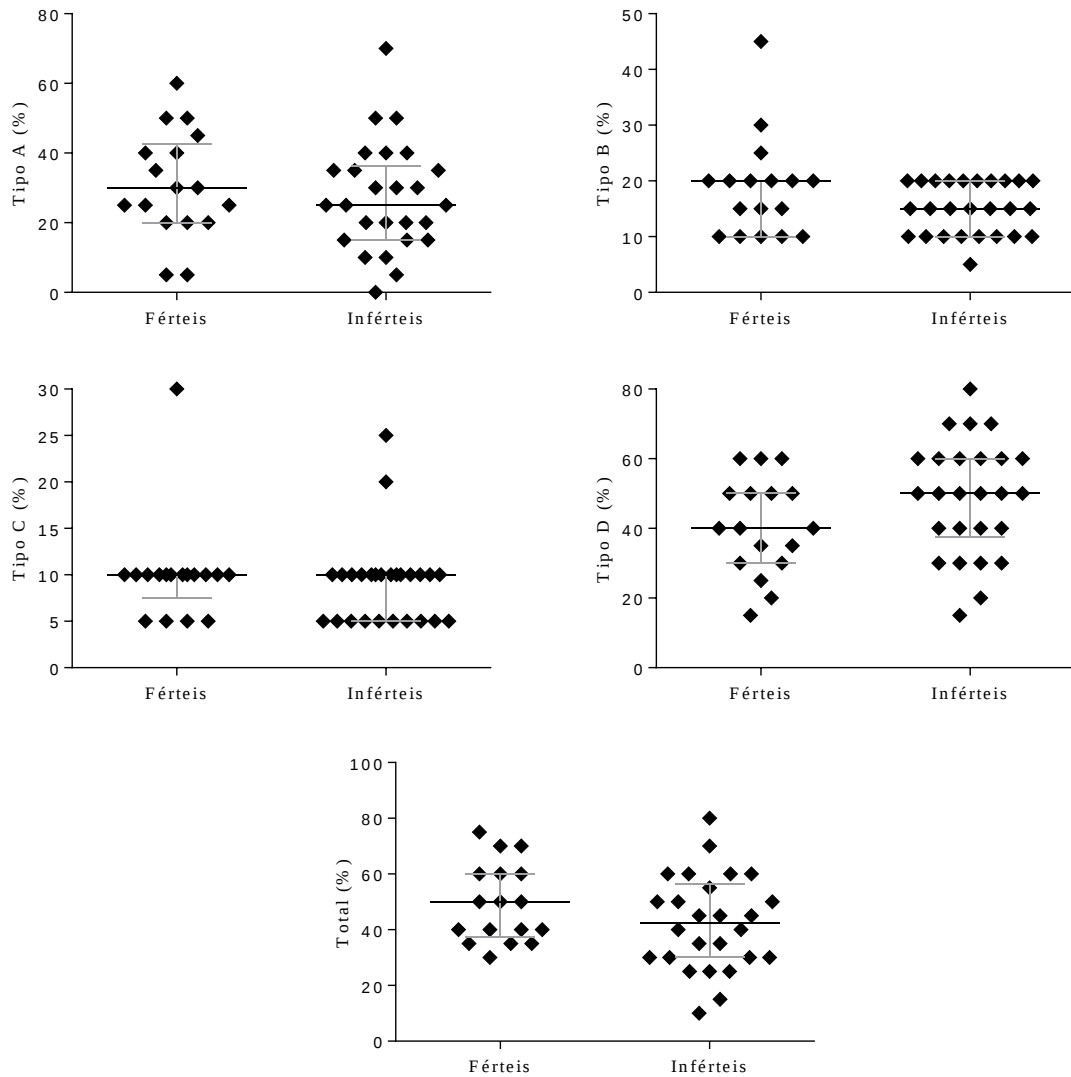


Figura 6. Motilidade espermática. Tipo A (motilidade progressiva rápida); tipo B (motilidade progressiva lenta); tipo C (motilidade não progressiva); tipo D (imóveis); total (A+B).

Valores expressos como mediana (1ºquartil - 3ºquartil), $P > 0,05$. Teste de Mann-Whitney, Férteis ($n = 17$) e Inférteis ($n = 26$).

Análises Seminais Funcionais

Tanto a porcentagem de células com a membrana plasmática íntegra (Figura 7) como o potencial mitocondrial e produção de ânion superóxido na matriz mitocondrial não foram significativamente diferentes entre os voluntários férteis e inférteis (Figura 8).

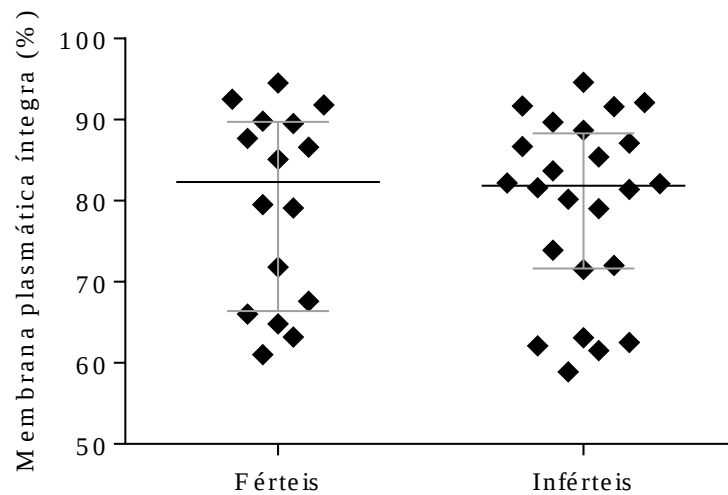


Figura 7. Estabilidade da membrana plasmática.

Valores expressos como mediana (1ºquartil - 3ºquartil), $P > 0,05$. Teste de Mann-Whitney, Férteis ($n = 16$) e Inférteis ($n = 24$).

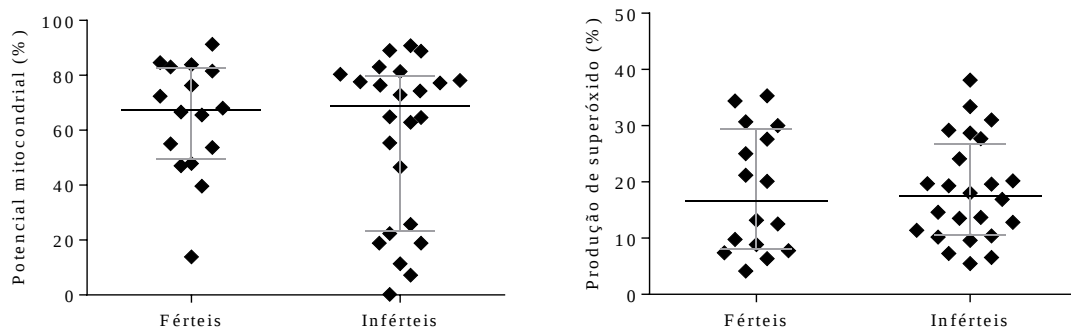


Figura 8. Potencial mitocondrial e produção de ânion superóxido na matriz mitocondrial.

Valores expressos como mediana (1ºquartil - 3ºquartil), $P > 0,05$. Teste de Mann-Whitney, Férteis ($n = 16$) e Inférteis ($n = 24$).

Os danos na membrana plasmática foram positivamente correlacionados com a produção de ânion superóxido na matriz mitocondrial (Figura 9).

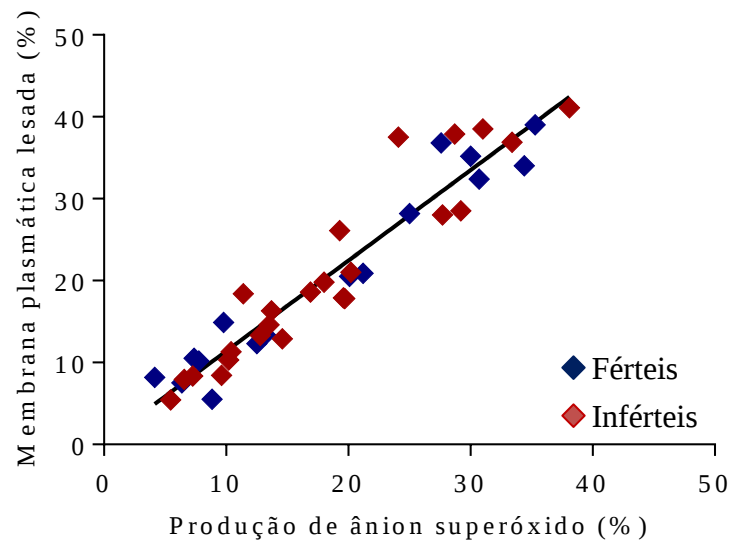


Figura 9. Gráfico de dispersão exibindo a correlação entre os danos na membrana plasmática e a produção de ânion superóxido na matriz mitocondrial. $R^2 = 0,91$, $n = 40$. Equação linear: $y = 1,104 x + 0,3510$, onde y é igual à produção de ânion superóxido na matriz mitocondrial e x corresponde ao dano na membrana plasmática.

Os voluntários férteis e inférteis não mostraram discrepâncias significativas com relação à integridade da membrana plasmática em conjunto com a acrossomal, seja na porcentagem da membrana plasmática e acrossomal íntegras e lesadas, membrana plasmática íntegra e acrossomal lesada e membrana plasmática lesada e acrossomal íntegra (Figura 10).

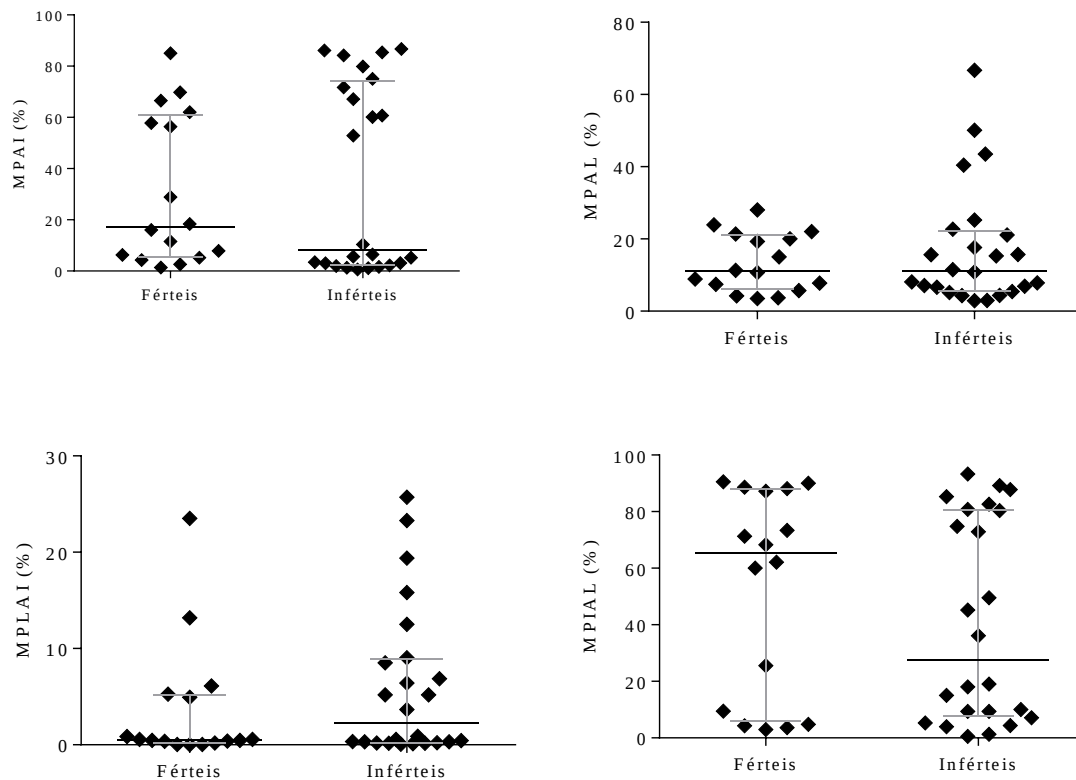


Figura 10. Integridade da membrana plasmática e acrossomal.

MPAI (membrana plasmática e acrossomal íntegras); MPAL (membrana plasmática e acrossomal lesadas); MPLAI (membrana plasmática lesada e acrossomal íntegra); MPIAL (membrana plasmática íntegra e acrossomal lesada).

Valores expressos como mediana (1ºquartil - 3ºquartil), $P > 0,05$. Teste de Mann-Whitney, Férteis ($n = 16$) e Inférteis ($n = 24$).

Análises da Proteína Espermática SP22

Quantificação da Proteína Espermática SP22 pelo Método de ELISA

Os dados referentes à concentração da proteína de membrana SP22 não mostraram diferenças significativas entre os voluntários férteis e inférteis (Figura 11).

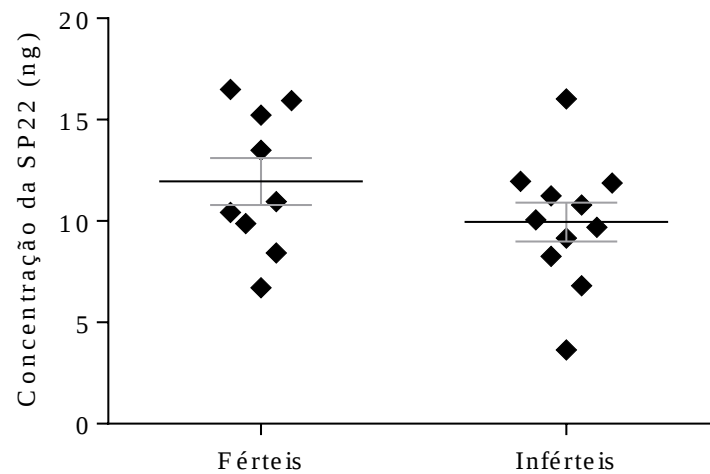


Figura 11. Concentração da proteína de membrana espermática SP22 de espermatozoides ejaculados avaliada pelo método de ELISA.

Valores expressos como média $\pm$ E.P.M., $P > 0,05$. Teste t de Student, Férteis ($n = 9$) e Inférteis ($n = 11$).

Não houve correlação entre a concentração da proteína SP22 com a integridade da membrana plasmática e morfologia espermática tanto para os voluntários férteis (Figura 12A) como para os inférteis (Figura 12B).

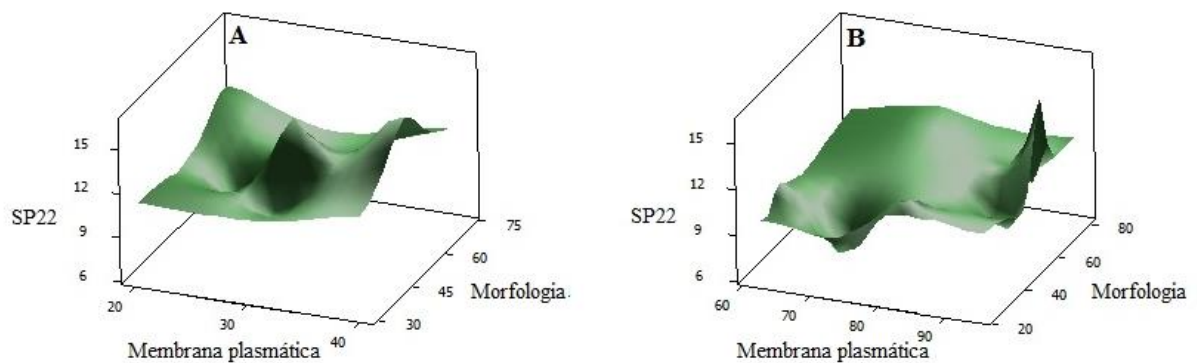


Figura 12. Representação da correlação entre a concentração da proteína de membrana SP22 quantificada pelo método de ELISA (ng SP22/ μ g de proteínas de membrana), integridade de membrana (%) e anormalidades morfológicas (%). (A) Voluntários férteis ($R^2 = 0,09$) e (B) voluntários inférteis ($R^2 = 0,16$). A escala de intensidade verde corresponde a concentração da SP22.

Imunolocalização da Proteína Espermática SP22

A imunolocalização da proteína de membrana SP22, apresentada na Figura 13, revelou a existência de células não marcadas e de células com marcação em diferentes regiões do espermatozoide: apenas na região equatorial; se estendendo da região equatorial até a base da cabeça; no pescoço e peça intermediária; na cauda.

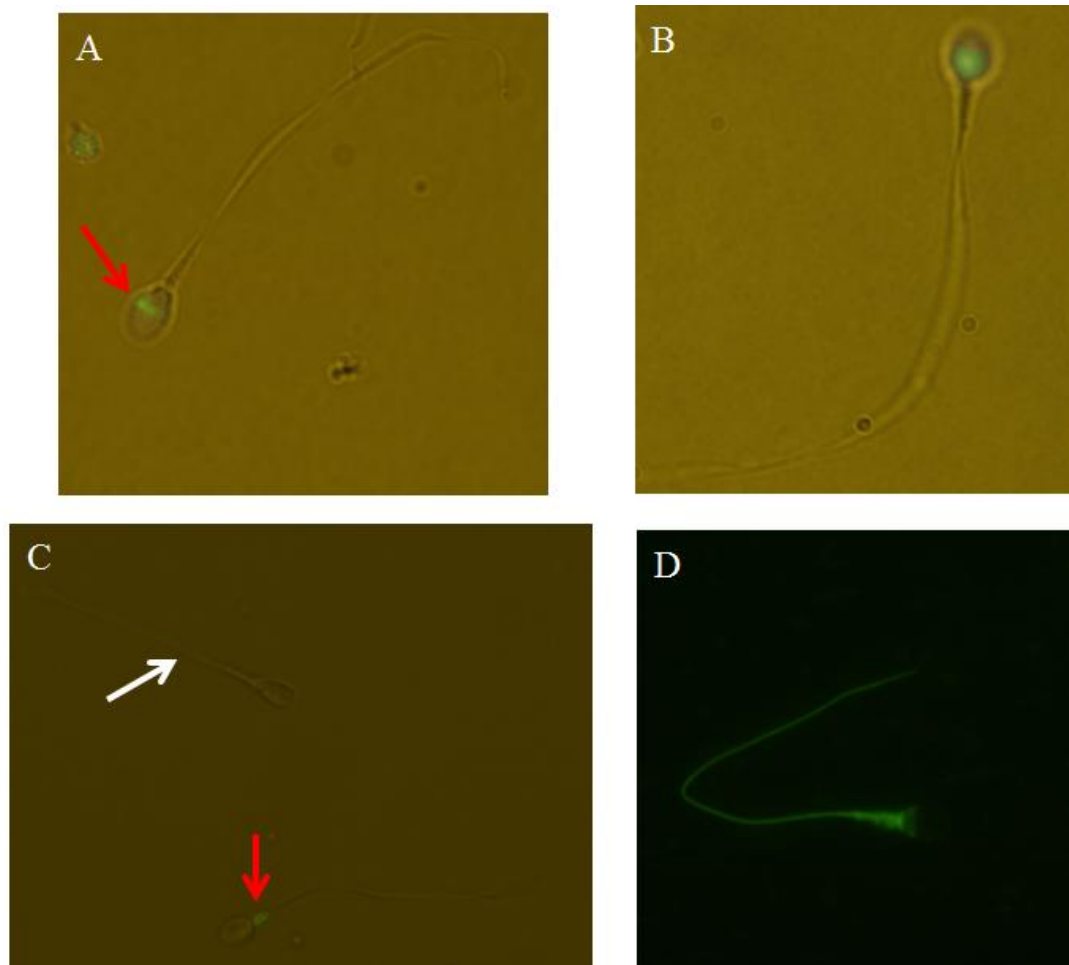


Figura 13. Imunolocalização, em espermatozoide humano, da proteína de membrana espermática SP22. (A) região equatorial; (B) região equatorial se estendendo até a pós-acrossomal; (C) pescoço e peça intermediária; (D) peça intermediária e cauda. Aumento de 100X. A seta vermelha indica a SP22 e a seta branca aponta um espermatozoide sem marcação.

Dosagens Hormonais

As concentrações séricas de testosterona livre, SHGB, LH e FSH são mostradas na Figura 14. Os voluntários inférteis exibiram aumento na concentração de LH quando

comparados aos férteis, enquanto as concentrações séricas dos demais hormônios permaneceram semelhantes.

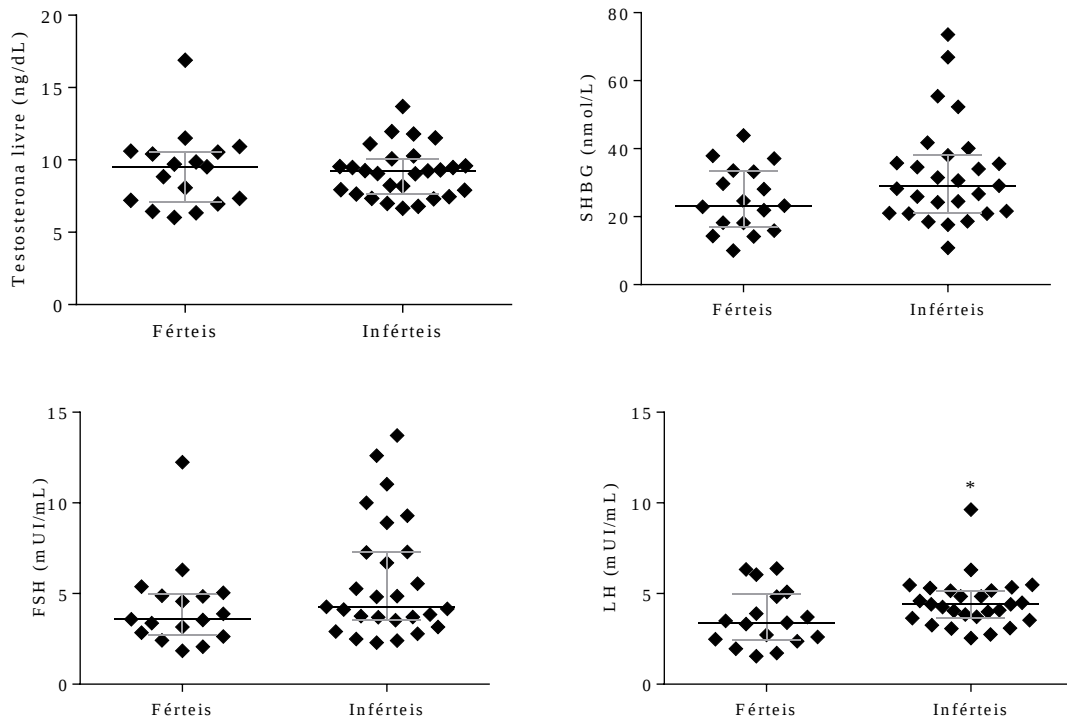


Figura 14. Dosagens hormonais.

Valores expressos como mediana (1ºquartil - 3ºquartil), * $P = 0,0441$ e $P > 0,05$. Teste de Mann-Whitney, Férteis ($n = 17$) e Inférteis ($n = 27$).

PACIENTES INFÉRTEIS ATENDIDOS PELO CENTRO DE REPRODUÇÃO

A média da idade dos pacientes foi de 33,75 anos e a média referente ao tempo de infertilidade de 4,26 anos.

Os dados referentes às médias e desvio padrão das análises seminais convencionais incluindo volume seminal, concentração espermática, número total de espermatozoides, motilidade, morfologia e vitalidade são apresentadas na Tabela 3. A motilidade progressiva rápida e a morfologia foram os únicos parâmetros que não se encontraram dentro dos valores limiares considerados normais pela WHO (2010).

Tabela 3. Análises seminais convencionais.

Variáveis Analisadas	Média ± Desvio Padrão Ejaculado	Média ± Desvio Padrão Pós swim-up	Valores de Referência
Volume seminal (mL)	2,6 ± 1,4	1,7 ± 0,9	≥ 1,5
Concentração espermática (×10 ⁶ /mL)	120,9 ± 160,9	16,9 ± 26,7	≥ 15
Número total de espermatozoides (×10 ⁶ /ejaculado)	296,1 ± 373,9	24,7 ± 33,2	≥ 39
Motilidade do tipo A (%)	1,3 ± 1,3	-	≥ 32
Motilidade do tipo B (%)	55,9 ± 15	-	-
Motilidade do tipo C (%)	16,7 ± 4,7	-	-
Motilidade do tipo D (%)	26,2 ± 16,6	-	-
Motilidade total (%)	57,2 ± 15,4	-	≥ 40
Morfologia normal (%)	1,1 ± 0,8	-	≥ 4
Vitalidade (% vivos)	87,9 ± 7,4	-	≥ 58

Motilidade progressiva rápida (Tipo A); motilidade progressiva lenta (Tipo B); motilidade não progressiva (Tipo C); imóveis (Tipo D); motilidade total (A+B).

Valores expressos como média ± E.P.M, n = 12.

Discussão

Nas últimas décadas diversos estudos têm sugerido um declínio na saúde reprodutiva masculina com consequente aumento da infertilidade (Cordelli *et al.*, 2005; Winters & Walsh, 2014). Essa patologia traz consigo grandes consequências para a saúde pública, econômica, psicossocial e conjugal (Nallela *et al.*, 2006). Apesar das análises seminais convencionais de rotina serem subjetivas e propensas a variabilidade intra e interobservador (Garrido *et al.*, 2002; Cordelli *et al.*, 2005) são a primeira e primordial etapa na investigação da infertilidade masculina (Nallela *et al.*, 2006) e são adequadas para identificar lesões mais graves na função reprodutiva como por exemplo em casos de azoospermia e oligozoospermia (Aitken *et al.*, 1985).

A precisa mensuração do volume seminal sinaliza uma variedade de condições que incluem ejaculação retrógrada parcial, inflamação das glândulas sexuais acessórias (WHO, 2010), obstrução do ducto ejaculatório e ausência bilateral congênita dos ductos deferentes (de la Taille *et al.*, 1998; Daudin *et al.* 2000; von Eckardstein *et al.*, 2000). Como os voluntários inférteis não relataram portar nenhuma dessas condições, a hipospermia observada possivelmente pode ser atribuída a alterações da capacidade secretora das glândulas seminais que contribuem com até 85% do volume ejaculado total (Ortega-Ferrusola *et al.*, 2017).

A diminuição do número total de espermatozoides no ejaculado também observada nesses voluntários é uma consequência direta da hipospermia, já que esse número é calculado a partir do volume ejaculado e da concentração espermática que foi comparável entre os grupos. Outra consequência da diminuição do volume seminal ejaculado é a redução do volume pós *swim-up*, já que a quantidade de solução de isolamento de espermatozoides adicionada no processamento das amostras é proporcional ao volume ejaculado e é a porção recuperada desta solução que é mensurada.

Além da redução do volume pós *swim-up* os voluntários inférteis também exibiram redução na concentração espermática e no número total de espermatozoides pós-processamento. Como a técnica de *swim-up* e suas modificações dependem da motilidade dos espermatozoides é suposto que a diminuição da concentração espermática é devido ao maior número de espermatozoides do tipo D presentes no ejaculado dos voluntários inférteis, ainda que esse tipo de motilidade não tenha sido significativamente diferente quando comparada a dos voluntários férteis. A diminuição tanto do volume como da concentração espermática pós *swim-up* justificam a diminuição do número total de espermatozoides pós-processamento.

A observação mais surpreendente de análises de esfregaços de espermatozoides ejaculados seja de homens férteis ou inférteis é que a porcentagem de espermatozoides que são morfollogicamente malformados supera a porcentagem de espermatozoides normais (Auger, 2010). Neste estudo, os voluntários férteis exibiram uma proporção equivalente de espermatozoides normais e anormais bem como apresentaram um percentual maior de espermatozoides morfollogicamente normais em relação aos voluntários inférteis. A redução na quantidade de espermatozoides normais exibida tanto pelos voluntários inférteis quanto pelos pacientes inférteis pode ser consequência de fatores complexos que interferem na espermiogênese e refletem em um potencial menor de fertilização (Auger, 2010).

Sabe-se que os andrógenos e as gonadotrofinas desempenham papel crucial na função reprodutiva masculina e que variações nas concentrações desses hormônios podem afetar não somente a concentração espermática, como também a motilidade e a morfologia (Meeker *et al.*, 2007). Os voluntários inférteis apresentaram concentração sérica elevada do LH e a concentração elevada desse hormônio pode ser resultado de hipogonadismo hipergonadotrófico o que pode implicar não apenas no comprometimento da espermatogênese, mas também na função das células de Leydig (Ramanujam *et al.*, 2000). Vale ressaltar que esse dado é condizente com as alterações observadas no número total de espermatozoides ejaculados e na morfologia espermática.

Como até 50% dos casos de infertilidade são atribuídas ao homem é crucial o desenvolvimento de novos métodos diagnósticos que forneçam informações não acessíveis pela microscopia convencional e minimizem tanto a variabilidade humana como a estatística, já que apenas uma pequena proporção de espermatozoides é analisada em comparação a população total (Barroso *et al.*, 2016).

A citometria de fluxo representa uma abordagem automatizada, multiparamétrica, objetiva, rápida, sensível e reprodutível (Garrido *et al.*, 2002) e é uma ferramenta útil tanto na clínica e andrologia para avaliar o potencial de fertilidade individual, especialmente em candidatos submetidos a técnicas de reprodução assistida, como na toxicologia reprodutiva para estudar efeitos das exposições ambientais, ocupacionais e terapêuticas (Cordelli *et al.*, 2005).

Esse foi o primeiro estudo a padronizar análises seminais funcionais multiparamétricas pela técnica de citometria de fluxo. Como existe uma grande variedade de configurações de lasers disponíveis para essa técnica e devido ao alto custo dos equipamentos que possuem

lasers capazes de excitar fluorocromos em faixas mais sensíveis como, por exemplo, no ultravioleta (300-400 nm), decidimos realizar a padronização em 2 citômetros diferentes, um equipado com o laser violeta e outro com uma configuração mais básica, visando uma maior abrangência de uso dos protocolos.

Como os coeficientes de determinação dos protocolos propostos foram próximos de 1 tanto no citômetro equipado com os 3 lasers como no equipado com apenas 2, fica evidente que os protocolos são adequados para a utilização.

A ausência de alterações nas análises seminais funcionais pode ser decorrente da utilização de sêmen selecionado em tais análises sendo, portanto, a investigação realizada apenas nos espermatozoides de melhor qualidade. Ainda assim, os danos na membrana plasmática foram positivamente correlacionados com a produção de ânion superóxido na matriz mitocondrial. Tradicionalmente, concentrações baixas de espécies reativas de oxigênio são essenciais para as funções espermáticas como capacitação, reação acrossômica e fusão espermatozoide-ovócito. Por outro lado, quando produzidas em concentrações elevadas exibem efeitos adversos sobre a funcionalidade espermática (Sharma *et al.*, 1999; Hossain *et al.*, 2011).

A proteômica é uma ferramenta útil que ajuda a identificar biomarcadores moleculares presentes no sêmen cuja alteração na concentração ou expressão pode facilitar o prognóstico, diagnóstico e desenvolvimento de novos tratamentos e terapias (Selvam & Agarwal, 2018). Este foi o primeiro estudo a quantificar a proteína de membrana espermática SP22 em espermatozoides de homens férteis e inférteis e a correlacionar a sua concentração com os danos da membrana plasmática, morfologia e motilidade espermáticas (dado não mostrado). Até o momento, 20 extratos de espermatozoides, sendo 9 de voluntários férteis e 11 de inférteis, foram quantificados pelo método de ELISA e as concentrações não foram significativamente diferentes entre os voluntários férteis e inférteis bem como não foram correlacionados com os parâmetros investigados. Contrariamente, An *et al.* (2011), em um estudo com homens normais e astenozoospermicos, demonstraram correlação positiva da SP22 com a motilidade espermática.

Neste estudo, a SP22 foi imunolocalizada apenas na região equatorial, se estendendo da região equatorial até base da cabeça, no pescoço e peça intermediária bem como na cauda do espermatozoide. Vale salientar que pelo menos parte dessas células, embora tenham sido previamente selecionadas por *swim-up* podem estar com a membrana plasmática danificada o

que resulta em padrão inespecífico de imunomarcção. A sua localização na região equatorial da cabeça apresenta uniformidade entre as diversas espécies em que já foi descrita, inclusive, em trabalho anterior, realizado pelo nosso grupo de pesquisa, em espermatozoides de duas raças de carneiros, onde a SP22 estava presente tanto na região equatorial como no pescoço do espermatozoide (Favareto *et al.*, 2010). Essa localização indica o seu envolvimento tanto na penetração da zona pelúcida como em etapas de fusão das membranas durante a fertilização como já demonstrado anteriormente por Klinefelter *et al.* (2002) em ratos e por Okada *et al.* (2002) em camundongos.

Whyhard *et al.* (2000) e Yoshida *et al.* (2003) também relataram a presença da SP22 na cauda de espermatozoides humano e sugeriram um possível papel dessa proteína também na motilidade espermática, o que parece ser plausível, uma vez que dois estudos independentes, conduzidos por Sun *et al.* (2014) e An *et al.* (2011), evidenciaram redução na concentração dessa proteína em homens astenozoospermicos, sendo que a redução foi proporcional à severidade da astenozoospermia (An *et al.*, 2011). Como os pacientes exibiram redução na motilidade progressiva rápida, a avaliação da proteína de membrana SP22 nos extratos de espermatozoides desses pacientes é uma análise complementar de alta relevância.

Estudos que dependem de amostras humanas podem ser especialmente laboriosos, dispendiosos e demorados. No caso do presente trabalho as análises ainda não foram finalizadas, uma vez que ainda falta quantificar a SP22 de algumas amostras. 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.

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 orgasmo 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*. 1st 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*. 1st 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*. 3rd 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*. 1st 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*. 1st 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*. 2nd 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., Mieusset 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*. 2nd 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*. 4th 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*. 2nd 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*. 2nd ed., New York: Springer Science, 2002, p.389-403.
- Hod, Y.; Pentyala, 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 sēmen 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*. 2nd 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*, 3rd 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*, 2nd 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*. 2nd ed., Cambridge: Cambridge University Press, 2017, p.73-87.

- Sullivan, R.; Miesusset, 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-Jedrzejowska, R.; Wolski, J. K.; Slowikowska-Hilczner, 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*. 3rd 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, 5th 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.

Comité de Ética



FACULDADE DE MEDICINA DE
BOTUCATU -UNESP



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Caracterização da proteína espermática SP22 como um biomarcador de fertilidade em seres humanos

Pesquisador: Josiane de Lima Rosa

Área Temática: Reprodução Humana (pesquisas que se ocupam com o funcionamento do aparelho reprodutor, procriação e fatores que afetam a saúde reprodutiva de humanos, sendo que nessas pesquisas serão considerados "participantes da pesquisa" todos os que forem afetados pelos procedimentos delas):
(Reprodução Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP;);

Versão: 1

CAAE: 48454815.3.0000.5411

Instituição Proponente: Departamento de Morfologia

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.228.614

Apresentação do Projeto:

A infertilidade afeta cerca de 15% dos casais em idade reprodutiva, sendo o homem responsável por cerca da metade dos casos. A diminuição da fertilidade masculina é devido a uma variedade de condições que incluem malformações congênitas, distúrbios genéticos e endócrinos, doenças infecciosas e inflamatórias e exposição a tóxicos ambientais. Nos últimos anos, considerável esforço tem sido feito por vários pesquisadores para identificar e caracterizar proteínas espermáticas que são funcionalmente importantes para o processo de fertilização. Diversas proteínas espermáticas, bem como proteínas do fluido epididimário e plasma seminal, têm sido associadas com o potencial fértil e a proteína espermática SP22 (Sperm Protein, 22KDa) tem demonstrado ser um biomarcador de fertilidade masculina. Em ratos, está bem estabelecido que os níveis de SP22 em extratos de espermatozoides da cauda epididimária correlacionam-se com a fertilidade dos gametas. Essa proteína também já foi descrita em outras espécies animais, tais como equinos, bovinos, caprinos, aves e no ser humano. No entanto, para incorporar este biomarcador em estudos epidemiológicos e clínicos são necessários dados quantitativos em

Endereço: Chácara Butignolli, s/n

Bairro: Rubião Junior

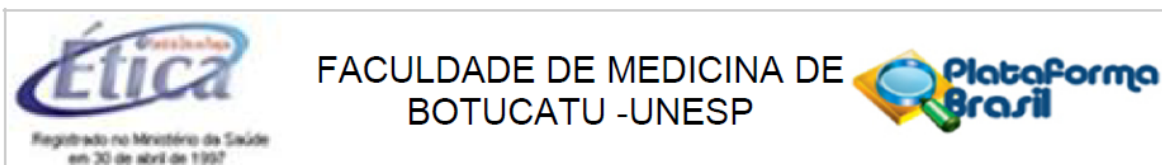
UF: SP

Município: BOTUCATU

Telefone: (14)3880-1608

CEP: 18.618-970

E-mail: capellup@fmb.unesp.br



Continuação do Parecer: 1.228.614

humanos. Assim, o presente estudo tem por objetivos padronizar a técnica de quantificação da proteína espermática SP22 em sêmen humano e avaliar o potencial desta proteína como um biomarcador de fertilidade masculina. Será realizado um estudo clínico prospectivo caso-controle em amostras seminais de 100 homens atendidos pelo serviço de fertilização in vitro (FIV)

da Escola Paulista de Medicina (EPM), já excluídos aqueles em que no casal haja fator feminino de infertilidade, como por exemplo, a endometriose. Estes homens serão agrupados de acordo com os resultados das FIV (gravidez ou não após o procedimento de reprodução assistida). Os espermogramas serão realizados conforme preconizado pela Organização Mundial da Saúde (2010), avaliando-se a concentração, motilidade, morfologia espermática e volume seminal. Além disso, análise funcional do sêmen, investigando-se fragmentação do DNA espermático, atividade mitocondrial, integridade acrossômica e níveis da SP22. A correlação entre esses parâmetros será investigada. A localização da SP22 será feita por

imunocitoquímica e a sua quantificação por ELISA. Este estudo receberá aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu (UNESP), Instituição Proponente, e do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), Instituição Coparticipante, e os indivíduos incluídos fornecerão consentimento por escrito. Pretende-se identificar níveis de SP22 que possam contribuir para o

delineamento de um diagnóstico de fertilidade/infertilidade humana masculina, para ser empregado em estudos clínicos e epidemiológicos.

Objetivo da Pesquisa:

Geral: Padronizar a técnica de quantificação da SP22, uma proteína de membrana espermática, em sêmen humano e avaliar o seu potencial preditivo como um biomarcador de fertilidade masculina.

Secundários: Padronizar a técnica de quantificação da proteína espermática SP22 em sêmen humano; Realizar um estudo clínico prospectivo caso-controle para avaliar a concentração, motilidade, morfologia espermática e volume seminal em amostras de sêmen humano; Avaliar a funcionalidade seminal dos indivíduos através de testes de fragmentação do DNA espermático, atividade mitocondrial e integridade acrossômica; Quantificar, nessas amostras, os níveis de SP22; Investigar a correlação entre SP22, parâmetros seminais e espermáticos e a fertilidade dos indivíduos incluídos no estudo, a fim de avaliar o potencial preditivo da SP22 como um biomarcador de fertilidade masculina

Endereço: Chácara Butignolli, s/n

Bairro: Rubião Junior

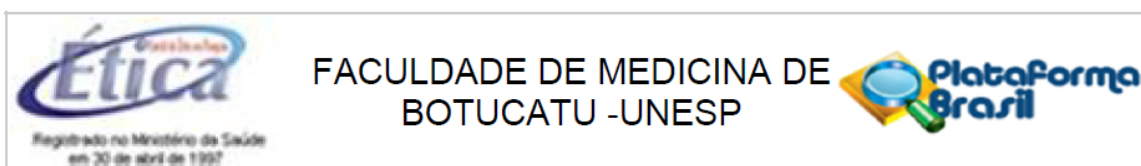
CEP: 18.618-970

UF: SP

Município: BOTUCATU

Telefone: (14)3880-1608

E-mail: capellup@fmb.unesp.br



Continuação do Parecer: 1.228.614

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: Não apresenta riscos aos indivíduos incluídos.

Benefícios: Não apresenta benefícios aos indivíduos incluídos. No entanto, esta pesquisa visa incorporar a SP22 como um potencial biomarcador em estudos epidemiológicos e clínicos, como um parâmetro preditivo de fertilidade/infertilidade.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Estudos pré-clínicos têm demonstrado correlação positiva entre a SP22 e a fertilidade em várias espécies animais. Para incorporar este potencial biomarcador em estudos epidemiológicos e clínicos, como um parâmetro preditivo de fertilidade/infertilidade, são necessários dados quali- e quantitativos em seres humanos.

O presente estudo pretende padronizar a técnica de quantificação da SP22 em amostras seminais humanas e avaliar como esses níveis se correlacionam com os parâmetros espermáticos e a fertilidade dos sujeitos incluídos no estudo.

O projeto é inédito e espera-se que os resultados tragam contribuição significativa para as investigações de fertilidade/infertilidade humana e, possivelmente, de contraceptivos masculinos.

A equipe de trabalho é composta por pesquisadores da UNESP, UNIFESP e US EPA – Environmental Protection Agency. O caráter multi-institucional, a complexidade das análises a serem realizadas, especialmente os testes estatísticos, além do tempo demandado para a realização do projeto, evidenciam a adequação ao programa de Doutorado.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos estão apresentados de forma adequada.

O trabalho também será submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP, através de coparticipação).

Recomendações:

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O projeto está bem escrito, apresentando no seu cronograma todas as fases de execução e os papéis desempenhados pelas instituições envolvidas, a saber: coleta dos dados, que será realizado na UNIFESP (coleta de material/sêmen); quantificação da proteína espermática SP22 pelo Método ELISA que será realizada no Laboratório de Biologia e Toxicologia do IB - Unesp Botucatu

Endereço: Chácara Butignolli, s/n

Bairro: Rubião Junior

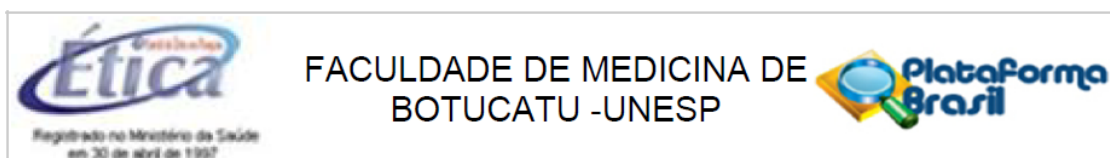
CEP: 18.618-970

UF: SP

Município: BOTUCATU

Telefone: (14)3880-1608

E-mail: capellup@fmb.unesp.br



Continuação do Parecer: 1.228.614

Considerações Finais a critério do CEP:

Projeto APROVADO, deliberado em reunião do CEP de 14/09/2015, sem necessidade de envio à CONEP.

O CEP, no entanto, solicita aos pesquisadores que tão logo o presente estudo seja concluído, deverá ser enviado o respectivo "Relatório Final de Atividades", via plataforma Brasil através de "NOTIFICAÇÃO"

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_544678.pdf	03/07/2015 17:45:31		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	PB_XML_INTERFACE_REBEC.xml	03/07/2015 17:45:32	Josiane de Lima Rosa	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	18/08/2015 12:59:08	Josiane de Lima Rosa	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_pesquisa.pdf	18/08/2015 12:59:46	Josiane de Lima Rosa	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Autorizacao_proponente.pdf	18/08/2015 13:01:29	Josiane de Lima Rosa	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Autorizacao_co_participante.pdf	18/08/2015 13:02:45	Josiane de Lima Rosa	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto.pdf	18/08/2015 12:56:43	Josiane de Lima Rosa	Aceito
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_544678.pdf	18/08/2015 13:04:08		Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: Chácara Butignolli, s/n

Bairro: Rubião Junior

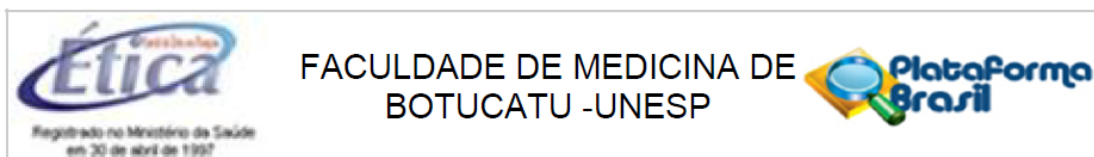
CEP: 18.618-970

UF: SP

Município: BOTUCATU

Telefone: (14)3880-1608

E-mail: capellup@fmb.unesp.br



Continuação do Parecer: 1.228.614

BOTUCATU, 15 de Setembro de 2015

Assinado por:
SILVANA ANDREA MOLINA LIMA
(Coordenador)

Endereço: Chácara Butignolli, s/n

Bairro: Rubião Junior

CEP: 18.618-970

UF: SP

Município: BOTUCATU

Telefone: (14)3880-1608

E-mail: capellup@fmb.unesp.br

Termo de Consentimento

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

Resolução 466/2012

CONVIDO, o Senhor para participar do Projeto de Pesquisa intitulado “Caracterização da proteína espermática SP22 como um biomarcador de fertilidade em seres humanos”, que será desenvolvido por mim, Josiane de Lima Rosa, bióloga, doutoranda, sob orientação da Professora Dra. Wilma De Grava Kempinas do Instituto de Biociências de Botucatu, Departamento de Morfologia.

Estou estudando uma proteína que se encontra na membrana do espermatozoide, denominada SP22. Para que eu possa obter dados é preciso que você colete seu sêmen para realização das análises convencionais e funcionais e seu sangue para realização das dosagens hormonais. Não existe risco na coleta de sêmen e sangue.

Além disso, o Senhor responderá um questionário sobre seu estado de saúde.

Não existem benefícios em particular para você neste estudo. No entanto, você estará contribuindo com uma pesquisa que visa incorporar a proteína SP22 como um potencial biomarcador que irá informar sobre a fertilidade ou infertilidade.

Fique ciente de que sua participação neste estudo é voluntária e que mesmo após ter dado seu consentimento para participar da pesquisa, você poderá retirá-lo a qualquer momento.

Este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido foi elaborado em 2 vias originais de igual teor, o qual 01 via será entregue ao Senhor devidamente rubricada, e a outra via será arquivada e mantida pela pesquisadora por um período de 5 anos após o término da pesquisa.

Qualquer dúvida adicional você poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa através dos telefones (14) 3880-1608 ou 3880-1609 que funciona de 2ª a 6ª feira das 8:00 às 11:30 horas e das 14:00 às 17 horas, na Chácara Butignolli s/nº em Rubião Júnior – Botucatu - São Paulo. Os dados de localização dos pesquisadores estão abaixo descrito:

Após terem sido sanadas todas minhas dúvidas a respeito deste estudo, CONCORDO EM PARTICIPAR de forma voluntária, estando ciente que todos os meus dados estarão resguardados através do sigilo que os pesquisadores se comprometeram. Estou ciente que os resultados desse estudo poderão ser publicados em revistas científicas, sem, no entanto, que minha identidade seja revelada.

Botucatu, ____ / ____ / ____

Pesquisadora

Participante da Pesquisa

Pesquisadora: Josiane de Lima Rosa

Endereço: Instituto de Biociências de Botucatu, Departamento de Morfologia, Laboratório de Biologia e Toxicologia da Reprodução e do Desenvolvimento (ReproTox) - UNESP/Rubião Júnior. Rua Prof. Dr. Antônio Celso Wagner Zanin, 250

Telefone: (14) 98187-1900

Email: josi.lr@outlook.com

Orientadora: Wilma De Grava Kempinas

Endereço: Instituto de Biociências de Botucatu, Departamento de Morfologia, Laboratório de Biologia e Toxicologia da Reprodução e do Desenvolvimento (ReproTox) - UNESP/Rubião Júnior. Rua Prof. Dr. Antônio Celso Wagner Zanin, 250

Telefone: (14) 3880-0476

Email: kempinas@ibb.unesp.br

Anamnese

IDENTIFICAÇÃO

Voluntário: _____

Data de nascimento: ____/____/____ Idade: _____ Contato: (____) _____

Profissão: _____

Filhos/Tempo de infertilidade: _____ Data da última concepção: ____/____/____

Idade da mulher: _____ ☐ Cisto ☐ Endometriose

Informação relevante: _____

PATOLOGIAS

- ☐ Varicocele. Há quanto tempo foi diagnosticado? _____
- ☐ Diabetes. Qual o tipo? _____ Há quanto tempo foi diagnosticado? _____
- ☐ Hipertensão. Há quanto tempo foi diagnosticado? _____
- ☐ Hiper/hipotireoidismo. Há quanto tempo foi diagnosticado? _____
- ☐ Obesidade
- ☐ Doenças sexualmente transmissíveis: _____
- ☐ Febre nos últimos 90 dias
- ☐ Outra: _____

HÁBITOS DE VIDA

- ☐ Tabagismo. Frequência: _____
- ☐ Etilismo. Frequência: _____
- ☐ Drogas/Substâncias tóxicas: _____

USO DE MEDICAMENTOS

- ☐ Sim: _____
- ☐ Não

CIRURGIAS UROLÓGICAS

- ☐ Sim: _____
- ☐ Não
- ☐ Outro tipo de cirurgia? _____

Apêndices

O Laboratório de Biologia e Toxicologia da Reprodução e do Desenvolvimento
(ReproTox) convida **VOLUNTÁRIOS** para

PESQUISA EM FERTILIDADE MASCULINA

REQUISITOS

- ✓ Ter entre **20 e 50 anos**;
- ✓ Ter **1 ou mais filhos** ou **estar tentando engravidar há mais de 8 meses** ou em **tratamento para engravidar**;
- ✓ **Não** ser vasectomizado.

TRATA-SE DE DOAÇÃO (SEM REMUNERAÇÃO) DE AMOSTRA DE SÊMEN E SANGUE

As amostras serão coletadas em laboratório clínico particular e todos os voluntários receberão, **gratuitamente**, os resultados dos exames (espermograma e dosagens hormonais).

Os interessados devem entrar em contato pelo telefone e/ou e-mail abaixo

Fique por dentro da sua saúde reprodutiva!

 (14) 98187-1900

Antecipadamente, agradecemos a colaboração

 josi.lr@outlook.com

unesp 



ReproTox



