**FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**

Eduardo Domingos Borges

**Aplicação do método de monitoramento de reações
múltiplas (MRM-profiling) para a caracterização
lipídica de espermatozoides de homens férteis e
subférteis**

**Ribeirão Preto
2020**

EDUARDO DOMINGOS BORGES

**Aplicação do método de monitoramento de reações múltiplas (MRM-
profiling) para a caracterização lipídica de espermatozoides de homens
férteis e subférteis**

Versão Original

Dissertação apresentada ao Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto para obtenção do Título de Mestre em Ciências Médicas.

Área de concentração: Ginecologia e Obstetrícia.

Orientadora: Professora Doutora Paula Andrea de Albuquerque Salles Navarro.

**Ribeirão Preto
2020**

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Borges, Eduardo Domingos

Aplicação do método de monitoramento de reações múltiplas (MRM-profiling) para a caracterização lipídica de espermatozoides de homens férteis e subférteis. Ribeirão Preto, 2020.

70 p. : il.; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Área de concentração: Ginecologia e Obstetrícia.

Orientadora: Navarro, Paula Andrea de Albuquerque Salles.

1. Lipídios 2. Fertilidade masculinas 3. Espectrometria de massas
4. MRM-profiling.

Eduardo Domingos Borges

Aplicação do método de monitoramento de reações múltiplas (MRM-profiling) para a caracterização lipídica de espermatozoides de homens férteis e subférteis.

Dissertação apresentada ao Departamento de
Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina
de Ribeirão Preto para obtenção do Título de Mestre
em Ciências Médicas.

Área de concentração: Ginecologia e Obstetrícia.

Aprovado em : ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Assinatura: _____

DEDICO aos meus pais, Elsa e Zal, pelo apoio irrestrito
e incondicional que permite que a realização de
qualquer sonho meu dependa apenas da minha própria
força de vontade.

Agradecimentos

À minha orientadora, Prof^ª. Dra. Paula Andrea de Albuquerque Salles Navarro, pela dedicação ao projeto e confiança no meu trabalho desde o início.

À Dra. Alessandra Vireque pela parceria de longa data e por todas as oportunidades de crescimento profissional que me proporcionou e ajudou a conquistar desde que iniciei minha carreira acadêmica, incluindo a realização deste projeto de mestrado.

À Dra. Christina Ferreira, e indiretamente a toda equipe do Bindley Bioscience Center, da Universidade de Purdue, por toda a assistência prestada desde os estágios iniciais do desenvolvimento do projeto, até o recebimento das amostras e realização das análises no espectrômetro de massas.

À Thalita Berteli por toda a ajuda prestada durante a realização deste trabalho e tantos outros momentos da minha jornada pela pós-graduação no Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.

À equipe de funcionários do Laboratório de Ginecologia e Obstetrícia, Setor de Reprodução Humana, do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, especialmente à Fabi, à Marilda, e à Cidinha por todo apoio técnico prestado.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) por meio do Programa de Excelência Acadêmica (PROEX).

O presente projeto foi desenvolvido com apoio da CAPES através da concessão de bolsa de estudo de Mestrado, Código de financiamento 001.

Resumo

BORGES, Eduardo Domingos. **Aplicação do método de monitoramento de reações múltiplas (MRM-profiling) para a caracterização lipídica de espermatozoides de homens férteis e subférteis**. 70 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2020.

Os lipídios espermáticos são fundamentais para a integridade do sistema de membranas e determinam muitas de suas importantes propriedades físico-químicas que, por sua vez, estão intimamente relacionadas com a capacidade de fertilização. Apesar de sua clara importância, os dados disponíveis sobre o perfil lipídico das células espermáticas humanas são limitados. As técnicas de espectrometria de massas mais comumente utilizadas para obter esses dados têm resultados informativos, porém amplamente dominados por sinais de fosfatidilcolina (PC) e liso-fosfatidilcolina (LPC) que impedem a detecção de outras classes lipídicas. Sendo assim, o principal objetivo deste estudo foi implementar o método de MRM-profiling utilizando um equipamento de espectrometria de massas com ionização por electrospray (ESI-MS) para a análise de células espermáticas de homens férteis e subférteis possibilitando a detecção simultânea de diversas classes lipídicas de interesse. Além disso, objetivou-se comparar os valores observados nos dois grupos a fim de identificar espécies lipídicas diretamente relacionadas à fertilidade masculina. Foi realizado um estudo prospectivo observacional onde extratos lipídicos de amostras seminais de 10 homens férteis e 10 homens subférteis foram analisados utilizando técnica e método previamente mencionados. Os lipídios foram extraídos usando o protocolo de Bligh & Dyer adaptado para espermatozoides e armazenados a -80 °C até a data de envio para análise. O envio foi feito via correio aéreo internacional em temperatura ambiente após selagem a vácuo. Uma análise inicial confirmou a eficiência do processo de extração e o transporte das amostras seladas à vácuo, em temperatura ambiente. A primeira etapa do método de MRM-profiling detectou a presença de 417 espécies lipídicas nas amostras (a partir de uma seleção inicial de 1287 feita em bases de dados). A análise estatística dos dados obtidos na segunda etapa identificou 162 lipídios diferencialmente expressos entre os dois grupos (utilizando o volcano plot com fold change = 1.5; valor de $p = 0,05$). Além disso, a análise hierárquica aglomerativa por cluster indicou uma clara separação entre

os grupos em relação a abundância de determinadas classes lipídicas. O estudo mostrou que ESI-MS associada ao método de MRM-profiling é uma abordagem bastante adequada para investigar a lipidômica de células espermáticas pois permitiu a avaliação do perfil lipídico dos espermatozoides humanos de maneira rápida e sensível, utilizando quantidades mínimas de amostra. As diferenças observadas entre os dois grupos são consistentes com a literatura, no entanto, serão necessários mais estudos para detectar possíveis biomarcadores para a fertilidade masculina. A lista de 417 lipídios detectados neste estudo tem grande valor na caracterização lipídica do espermatozoide humano e poderá servir como base para estudos futuros.

Palavras-chave: espermatozoide humano; fertilidade masculina; lipidômica, espectrometria de massas, MRM-profiling.

Abstract

BORGES, Eduardo Domingos. **Applying Multiple Reaction Monitoring (MRM)-profile to characterize the lipid contents of spermatozoa from fertile and sub-fertile men.** 70 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2020.

Sperm lipids are essential to the integrity of the membrane system and determine many of its important physicochemical properties, which, in turn, are closely related to the capacity for fertilization. Despite its undeniable relevance, the available data on the lipid profile of human sperm cells are limited. Mass spectrometry techniques most commonly used to obtain these data are largely dominated by phosphatidylcholine (PC) and lysophosphatidylcholine (LPC) signals that prevent the detection of other lipid classes. Thus, the main objective of this study was to implement the MRM-profiling method using electrospray ionization mass spectrometry equipment (ESI-MS) for the analysis of sperm cells from fertile and subfertile men, enabling the simultaneous detection of several classes lipids of interest. In addition, the work aimed to compare the values observed in the two groups in order to identify lipid species directly related to male fertility. A prospective observational study was carried where lipid extracts from seminal samples of 10 fertile men and 10 subfertile men were analyzed using the previously mentioned technique and method. Lipids were extracted using the Bligh & Dyer protocol adapted for sperm cells and stored at -80 °C until the date of analysis. Shipment was made via international airmail at room temperature after vacuum sealing. An initial analysis confirmed the efficiency of the extraction protocol as well as the handling of samples. The first stage of the MRM-profiling detected the presence of 417 lipid species in the samples (from an initial manual selection of 1287). The statistical analysis of the data obtained in the second step identified 162 different lipids between the two groups (using the volcano plot with fold change = 1.5; p value = 0.05). In addition, the cluster agglomerative hierarchical analysis indicated a clear separation between the groups in relation to certain lipid classes. The study showed that ESI-MS associated with MRM-profiling is an optimal approach to investigate the lipidomics of sperm cells, as it allowed the evaluation of the lipid profile of human sperm in a quick and sensitive way, using minimal sample quantities. The differences observed between the two groups are consistent with previous works; however, further studies are needed to single out possible biomarkers for male fertility. The list of 417 lipids detected in this study has great value in the lipid characterization of human sperm and could serve as a basis for future studies.

Keywords: human sperm; male fertility; lipidomics, mass spectrometry; MRM-profiling.

Lista de figuras

Figura 1. Esquematização da estrutura básica de um fosfolipídio.....	19
Figura 2. Esquema geral de um espectrômetro de massas com os principais exemplos de cada componente	21
Figura 3. Esquema geral de um espectrômetro de massas do tipo triplo quadrupolo.....	22
Figura 4. Representação do método de extração lipídica de Bligh e Dyer.....	31
Figura 5. Espectro resultante do perfilamento de PC e SM da amostra individual.....	36
Figura 6. Espectro de uma análise de perfilamento de PC e SM feito a partir de uma amostra de paciente subfértil.....	37
Figura 7. A) Representação visual da quantidade de lipídios em cada classe antes e depois da etapa de "discovery"	39
Figura 7. B) Distribuição dos MRMs selecionados por classe lipídica.....	39
Figura 8. Itens importantes selecionados pelo volcano plot nos métodos 1 e 2.....	41
Figura 9. Gráficos de análise de componentes principais 2D (PCA).....	42
Figura 10. Heatmap resultante da análise hierárquica aglomerativa por cluster representando o perfil das 25 fosfatidilcolinas mais relevantes.....	44
Figura 11. Heatmap resultante da análise hierárquica aglomerativa por cluster representando o perfil das 25 fosfatidilserinas mais relevantes.....	45

Figura 12. Heatmap resultante da análise hierárquica aglomerativa por cluster representando o perfil das 25 esfingomielinas mais relevantes..... **46**

Figura 13. Heatmap resultante da análise hierárquica aglomerativa por cluster representando o perfil dos 25 fosfatidilglicerois mais relevantes.....**47**

Lista de tabelas

Tabela 1. Identificação das amostras, concentração, e diluição utilizada para o grupo fértil.....	32
Tabela 2. Fragmento típico e perda neutra de cada classe.....	33
Tabela 3. Número de lipídios que apresentou intensidade relativa maior entre os grupos, separados por classe lipídica.....	40

Lista de siglas

EROs: Espécies reativas de oxigênio

ESI: Ionização por electrospray

ICSI: Injeção intracitoplasmática

LPC: Lisofofatidilcolina

MALDI: Desorção/ionização assistida por matriz

MRM: Monitoramento de reações múltiplas

MS: Espectrometria de massas

OMS: Organização Mundial da Saúde

PC: Fosfatidilcolina

PE: Fosfatidiletanolamina

PI: Fosfatidilinositol

PG: Fosfoglicerol

PLA: Fosfolipase A

PS: Fosfatidilserina

QQQ: Triplo quadrupólo

SM: Esfingomielina

TAG: Triacilglicerol

TOF: Tempo de voo

Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	16
1.1. Infertilidade Masculina.....	16
1.2. A membrana espermática e seu papel na fertilidade.....	17
1.3. Composição lipídica dos espermatozoides.....	18
1.4. Espectrometria de massas e o “MRM-profiling”	20
2. JUSTIFICATIVA.....	24
3. OBJETIVOS.....	26
3.1. Objetivo geral.....	26
3.2. Objetivos específicos.....	26
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	28
4.1. Delineamento experimental e aspectos éticos.....	28
4.2. Metodologias.....	28
4.2.1. Coleta e preparo dos espermatozoides.....	29
4.2.2. Extração lipídica e envio das amostras.....	29
4.2.3. Preparo das amostras e ESI-MS.....	30
4.2.4. Perfilamento por MRM (MRM-profiling)	31
4.2.5. Processamento dos dados e análise estatística.....	32
5. RESULTADOS.....	36
5.1. Padronização da técnica.....	36
5.2. Fase “discovery”	37
5.3. Fase “screening”	40
6. DISCUSSÃO.....	49
7. CONCLUSÕES.....	55
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	57
ANEXOS.....	64

Introdução

1. Introdução

1.1. Infertilidade masculina

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), a infertilidade é considerada uma doença e se caracteriza pela incapacidade de um casal heterossexual atingir uma gestação após um ano de atividade sexual regular, sem utilização de contraceptivos (ZEGERS-HOCHSCHILD et al., 2009). Essa condição atinge cerca de 15% dos casais em idade reprodutiva sendo que a maioria dos casos são observados em países em desenvolvimento, onde existe uma limitação de recursos para diagnóstico e tratamento (WHO, 1984; CATES; FARLEY; ROWE, 1985). O fator masculino é identificado como o único responsável em 20% dos casos e contribui com mais 30 a 40%, estando, portanto, presente em aproximadamente 50% de todos os casos de infertilidade (JAROW et al., 2002).

Muitos fatores, congênitos ou adquiridos, podem prejudicar a fertilidade masculina. Dentre os principais estão: anomalias genéticas, anomalias ou infecções no trato urogenital, distúrbios endócrinos, problemas imunológicos, varicocele, câncer, alterações no estilo de vida, exposição a fatores gonadotóxicos e outros fatores ambientais (NIESCHLAG, 2000). Apesar dos recentes avanços dos métodos diagnósticos disponíveis, as ferramentas para avaliar a fertilidade masculina ainda são bastante limitadas, e muitos casos de infertilidade ainda têm fatores indeterminados (HAMADA et al., 2011). Por via de regra, o diagnóstico inicial se apoia quase que exclusivamente na realização do espermograma. Apesar de fornecer informações importantes sobre parâmetros seminais como concentração, motilidade, e morfologia através de análise microscópica, esse exame é pouco preditivo em relação à capacidade de fertilização (LEWIS, 2007). Neste contexto, diferentes metodologias têm sido aplicadas com a finalidade de determinar com maior precisão a viabilidade espermática, dentre elas: testes de integridade do DNA espermático nuclear e mitocondrial, testes de função espermática, e testes de stress oxidativo (LEWIS, 2007). As técnicas mencionadas têm caráter experimental e ainda não são amplamente aplicadas, mas os resultados obtidos até aqui demonstram potencial, bem como a necessidade de estabelecer um protocolo eficiente, rápido, e acessível para auxiliar no processo diagnóstico (LEWIS, 2007; ALAHMAR, 2019).

O stress oxidativo, causado quando há um desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e sua remoção por meio de atividade enzimática, tem recebido

bastante atenção, uma vez que muitos estudos sugerem que essa condição esteja diretamente ligada à infertilidade e outros fatores associados, como a redução da mobilidade espermática, danos no DNA, maior risco de abortos recorrentes, e doenças genéticas (MACLEOD, 1943; AITKEN; CLARKSON; FISCHER., 1989; GRIVEAU et al., 1995; ALAHMAR, 2019). Células espermáticas são especialmente susceptíveis ao desequilíbrio oxidativo devido ao seu volume citoplasmático reduzido (e consequente perda de funções protetivas), e a presença de lipídios com alto grau de insaturação na sua membrana, que são a principal fonte de produção excessiva de EROs devido ao processo de peroxidação (AITKEN, 2003). Todo o destaque dado para o stress oxidativo nas últimas décadas, principalmente nos trabalhos de Aitken et al. (1989, 2001, 2006, 2014) chama a atenção para um componente crucial nesse e outros processos importantes para a viabilidade espermática: a membrana plasmática e sua composição lipídica.

1.2. A membrana espermática e seu papel na fertilidade

Além de participar ativamente da regulação do equilíbrio oxidativo através da movimentação de elétrons, permitindo a realização de operações redox (AITKEN, 2003), se sabe há algum tempo que a integridade e equilíbrio no sistema de membranas dos gametas é essencial para a fertilização natural e bom desenvolvimento embrionário (LENZI et al., 1996; ACTON et al., 2004). A composição da membrana espermática é especialmente relevante pois, devido à sua alta especialização, essas células “abriram mão” de algumas funcionalidades como a capacidade de sintetizar proteínas e realizar transporte vesicular, e dependem, portanto, da comunicação com o ambiente extracelular mediada pelo sistema de membranas para se capacitar (FLESCH; GADELLA, 2000).

Atualmente, o estudo da constituição bioquímica da membrana espermática é um dos principais campos de interesse no estudo da fisiologia e patologia desse gameta e, nesse contexto, os lipídios espermáticos tem recebido destaque pois desempenham papel muito importante na integridade das membranas e determinam muitas de suas propriedades físico-químicas (GLANDER et al., 2002; FUCHS et al., 2009). Teorias sobre os eventos de fusão da membrana sugerem que sua fluidez, por exemplo, é um pré-requisito para funções celulares normais durante essa etapa essencial da que antecede a fertilização (LENZI et al., 1996).

Antes do processo de fusão, as células espermáticas passam por dois importantes eventos que lhes conferem as características necessárias para torná-las aptas para este momento: a maturação, que ocorre no epidídimo; e a capacitação, que ocorre ao longo do trato reprodutor feminino (THOSIMORI; EDDY, 2014). Em ambos eventos se nota o protagonismo da membrana e dos lipídios. Além de mediar as modificações pós-translacionais que decorrem do contato com fatores produzidos pelas células epiteliais que recobrem o epidídimo e o trato reprodutor feminino, observa-se alterações na composição lipídica, principalmente em relação a proporção de fosfolipídios e colesterol (THOSIMORI; EDDY, 2014). Essa alteração é mais pronunciada durante a maturação, quando ocorre uma diminuição na razão entre colesterol/fosfolipídios, e aumento da presença de fosfatidilcolina em relação a outras subclasses de fosfolipídios como fosfatidiletanolamina e esfingomielina, resultando no aumento da fluidez da membrana (FLESCH; GADELLA, 2000; THOSIMORI; EDDY, 2014). Sendo assim, a caracterização da composição lipídica de espermatozoides é um pré-requisito importante para entender seu impacto na sequência de processos que esses gametas sofrem antes da fertilização (FUCHS et al., 2009). A análise comparativa detalhada, no caso tendo como base o perfil lipídico de homens comprovadamente férteis, pode contribuir também para preservação espermática e para aprimorar as técnicas de reprodução assistida (AKSOY et al., 2006; FUCHS et al., 2009).

1.3. Composição lipídica dos espermatozoides

Os lipídios estão presentes em todos os tipos celulares, onde participam de diversos processos biológicos. Estes vão desde a transcrição do código genético, até a regulação de vias metabólicas vitais e respostas fisiológicas. Além disso, são essenciais para o armazenamento e geração de energia, e para formação da estrutura das membranas celulares (KAWANO, 2011). Enquanto os triacilglicerídios (TAG) estão relacionados com a função energética, os lipídios mais relevantes para a composição da membrana celular animal e, portanto, também para esse estudo, são os glicerofosfolipídios, ou apenas fosfolipídios, como são mais comumente conhecidos (YEAGLE, 2005). A configuração básica dos fosfolipídios consiste em uma cabeça polar (hidrofílica) composta por um grupo fosfato e duas caudas de hidrocarbonetos, geralmente ácidos graxos variados que constituem uma porção apolar (hidrofóbica) (figura 1). O grupo fosfato pode ser modificado por moléculas orgânicas

simples dando origem as diferentes subclasses, são elas: ácido fosfatídico (PA), fosfatidilcolina (PC), fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilserina (PS), fosfatidilinositois (PI), e fosfatidilglicerol (PG). Apesar de possuírem uma base de esfingosina e apenas um ácido graxo, as esfingomielinas (SM) também podem ser consideradas como parte do grupo dos fosfolipídios devido à grande semelhança estrutural (YEAGLE, 2005). Algumas outras alterações na estrutura básica incluem fosfolipídios com apenas um ácido graxo, os chamados lisofosfolipídios, indicados com o prefixo (L-); ou ainda aqueles que apresentam uma ligação de éter (ao contrário de uma ligação de éster, mais comumente observada) na sua região apolar, geralmente indicados pelos sufixos (-O) ou (-p, no caso dos plasmalógenos) (YEAGLE, 2005).

Figura 1. Esquemática da estrutura básica de um fosfolipídio

Esquemática da estrutura básica de um fosfolipídio com indicação de sua porção polar (cabeça) onde “X” representa uma moléculas orgânica que pode modificar o grupo fosfato, e sua porção apolar (caudas) onde “R¹” e “R²” representam ácidos graxos. Fonte: pt.wikipedia.org/wiki/Fosfolípido.

A grande quantidade de lipídios na célula espermática e a predominância da PC foram observadas ainda nos primeiros estudos, realizados com amostras de salmões por Miescher¹ (1878, 1897 apud LOVERN e OLLEY, 1956). Poulos e White (1973) utilizaram técnicas de cromatografia em camada delgada para determinar as seguintes proporções entre as subclasses lipídicas mais abundantes no espermatozoide humano: PC (28,8%), PE (21,6%), SM (21,4%), PEp (9,4%), PS (4,7%), PCp (2,7%), PI (1,9%), e PG (1,6%). Análises subsequentes do perfil lipídico espermático humano confirmaram a prevalência de PC e PE, além da presença expressiva de ácidos graxos poli-insaturados e colesterol (LENZI et al.,

¹ Miescher, F. (1878). Verh. naturf. Gee. Basel, 6, 128.

Miescher, F. (1897). Histochemische und physiologische Arbeiten. Leipzig: Vogel.

1996; SCHILLER, 2000; LEßIG et al., 2004). Desde então, as análises de lipídios e outros metabólitos se expandiram consideravelmente, amparadas pelo desenvolvimento tecnológico, com destaque especial para o advento das técnicas de espectrometria de massas (FERREIRA et al., 2010).

1.4. Espectrometria de massas e o “MRM-profiling”

A espectrometria de massas é uma técnica analítica aplicável à identificação de compostos desconhecidos, de baixas concentrações e em misturas quimicamente complexas que permite tanto a detecção e determinação de uma estrutura molecular, quanto a sua quantificação através da relação entre massa e a carga (m/z) de elementos ionizados (SCHILLER et al., 2000). O espectrômetro é um equipamento composto, basicamente, por um sistema de introdução de amostras, uma fonte de ionização, um analisador de massas e um detector de dados (Figura 2) (BALDWIN, 1995). Em resumo, quando injetada no equipamento através de um capilar, a amostra recebe uma determinada carga proveniente da fonte de ionização que resulta na formação de gotículas de solvente e íons positivos. Após a evaporação do solvente, cargas positivas relativas aos íons de interesse deixam a gota e são separadas de acordo com sua m/z no analisador de massas (AEBERSOLD; MANN, 2003). No analisador, a separação é novamente feita por meio de uma corrente elétrica contínua ou alternada, gerando um campo eletrostático oscilante. Isso possibilita que os íons possam ser contabilizados de maneira ampla, como no caso de uma varredura, ou seletiva, quando se deseja apenas a passagem de determinados íons (GILLETTE; CARR, 2013; NASCIMENTO FILHO, 2017).

Figura 2. Esquema geral de um espectrômetro de massas com os principais exemplos de cada componente.

Fonte: Adaptado de Ferreira, 2017².

Técnicas de cromatografia ou cromatografia associada à espectrometria de massas, especialmente com fonte de desorção/ionização assistida por matriz e analisador por tempo de voo (MALDI-TOF) foram utilizadas com sucesso ao longo das duas últimas décadas para a análise do perfil lipídico seminal e investigação de diversas condições associadas a subfertilidade masculina (FORCE et al., 2001; SCHILLER et al., 2003; LEBIG et al., 2004; TAVILANI et al., 2007; NIMPTSCH et al., 2013; RIVERA-EGEA et al., 2018). No entanto, essa abordagem não é considerada a mais apropriada para realizar a caracterização precisa de amostras complexas, contendo várias subclasses de fosfolipídios, como é o caso dos espermatozoides. Os espectros resultantes de uma análise por MALDI-TOF, por exemplo, são geralmente dominados por sinais de PC e LPC, o que impede a detecção de outras subclasses. Além disso, a necessidade de se realizar a separação cromatográfica é custosa em relação ao tempo e recursos (PETKOVI, 2001; FUCHS; SCHILLER, 2008; BRESSLER et al., 2011; YANNEL et al., 2018).

Recentemente, um método de análise capaz de superar essas adversidades, denominado perfilamento por monitoramento de reações múltiplas (MRM-profiling), foi

² Ilustração apresentada durante uma aula por conferência intitulada “Discovery Lipidomics by MRM-profiling”, Metabolome Profiling Facility – Bindley Bioscience, 2017.

descrito por Ferreira et al. (2016). O MRM-profiling é capaz de analisar um conjunto de amostras de forma direta e com bastante precisão, por esse motivo essa abordagem tem grande valor para identificar substâncias discriminantes ou possíveis biomarcadores, e apresenta grande aplicabilidade no caso de diagnósticos (FERREIRA et al., 2016). Em geral, essa abordagem utiliza uma fonte de ionização por eletrospray (ESI/ESSI) e um analisador de massas do tipo triplo quadrupolo (QQQ), que garante a especificidade da técnica independentemente de separação prévia por meio de uma seleção dupla das moléculas de interesse com base na m/z dos seus íons precursores e de seus fragmentos, como mostra o esquema na figura 3 (FERREIRA et al., 2016).

Figura 3. Esquema geral de um espectrômetro de massas do tipo triplo quadrupolo.

Fonte: Adaptado de Nascimento Filho, 2017.

O método já foi aplicado com sucesso, por exemplo, para fazer o perfilamento químico do fluido cerebrospinal (FERREIRA et al., 2016), buscar biomarcadores relacionados à síndrome do ovário policístico no fluido folicular (CORDEIRO et al., 2017), e obter o perfil lipídico detalhado de oócitos e embriões (De LIMA, 2018). No entanto, apesar das claras vantagens e grande potencial para servir como base de um método diagnóstico auxiliar na avaliação da fertilidade masculinas, essa abordagem ainda não foi aplicada em amostras de espermatozoides humanos.

Justificativa

2. Justificativa

Dada a relevância do papel dos lipídios na composição da membrana espermática, a caracterização precisa do perfil lipídico de espermatozoides de homens comprovadamente férteis por ESI-MS, utilizando a abordagem de MRM-profiling trará informações cruciais que ajudarão a elucidar a dinâmica desses compostos na célula. Tais informações servirão como base para este e outros futuros estudos comparativos, que contribuirão para o maior entendimento da condição de infertilidade masculina, com a possibilidade de identificar biomarcadores. Além disso, a padronização das técnicas envolvidas para analisar quantidades muito pequenas de espermatozoides (no caso de homens sub-férteis) tem ainda potencial para o desenvolvimento de métodos diagnósticos que poderão ser facilmente aplicados em clínicas por todo o mundo, uma vez que as técnicas envolvidas são simples e de baixo custo.

Objetivos

3. Objetivos

3.1. Objetivo geral

- Caracterizar o perfil lipídico de espermatozoides de homens férteis e homens inférteis com oligoastenospermia.

3.2. Objetivos específicos

- Padronização das técnicas de extração lipídica seminal e espectrometria de massas por *electrospray* para concentrações espermáticas muito baixas;
- Determinação da presença ou ausência de determinadas espécies lipídicas em espermatozoides de homens comprovadamente férteis e homens inférteis com oligoastenospermia por espectrometria de massas;
- Definição e comparação objetiva dos perfis lipídicos de espermatozoides de homens férteis e inférteis, a fim de caracterizá-los;
- Identificação de um ou mais componentes lipídicos que possam ser considerados indicadores de qualidade seminal utilizando o método de MRM-profiling.

Material e métodos

4. Material e métodos

4.1. Delineamento experimental e aspectos éticos

Foi desenvolvido um estudo observacional analítico. O recrutamento dos participantes, a coleta e preparo do material, e os procedimentos de extração lipídica das amostras de sêmen humano foram realizados no Laboratório de Ginecologia e Obstetrícia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – HCFMRP-USP. Os procedimentos para a validação do protocolo de extração de lipídica, e das condições de armazenamento e envio das amostras foram realizados com o suporte da Invitra Tecnologia da Reprodução Assistida LTDA, sob a responsabilidade da Dra Alessandra Vireque. A etapa de análise dos extratos lipídicos por espectrometria de massas foi realizada em parceria com a Bindley Bioscience Mass Spectrometry Facility da Universidade de Purdue (EUA), sob a responsabilidade da Dra. Christina Ramires Ferreira. Esse estudo foi aprovado pela comissão de pesquisa do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia, bem como pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HCFMRP-USP Paulo (Número do Parecer: 2.748.533 - anexo 1).

4.1.1. Pacientes

Os pacientes foram convidados a participar da pesquisa mediante assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (anexo 2). Foram incluídos no estudo homens com idade entre 20 e 40 anos (SINGH *et al.*, 2003), que ficaram de 2 a 5 dias em abstinência sexual previamente a coleta do material seminal e não tinham histórico de câncer de qualquer localização, utilização pregressa ou atual de quimioterápicos ou outras medicações que sabidamente interfiram com a espermatogênese, febre ou infecção em atividade, e azoospermia. (GARDNER *et al.*, 2012).

O grupo de homens subférteis consistiu-se com pacientes do HCFMRP encaminhados para a realização de espermograma no Laboratório de Ginecologia e Obstetrícia, como parte do protocolo assistencial de investigação da infertilidade conjugal do Ambulatório de Esterilidade (AEST) e de Infertilidade (AIFE). Eles foram abordados enquanto aguardavam a realização do exame e aceitaram participar voluntariamente do estudo. Neste grupo foram inclusos somente os participantes que apresentaram uma contagem total de espermatozoides progressivos (CTEP) menor ou igual a 1 milhão (HAMILTON *et al.*,

2015; BORGES *et al.*, 2016). O grupo de homens férteis consistiu de voluntários recrutados a partir de uma lista de pacientes do ambulatório de gravidez de alto risco (GAR) do HCFMRP. Os participantes foram inicialmente contatados por telefone. Os interessados compareceram ao HCFMRP para realizar a coleta seminal e assinar o TCLE. Foram incluídos apenas homens com pelo menos um filho com idade de até 2 anos.

4.2. Metodologias

4.2.1. Coleta e preparo dos espermatozoides

Após a coleta do material seminal, uma alíquota de 0,5 ml foi utilizada para a realização do espermograma por microscopia óptica para determinação da concentração, motilidade, morfologia e vitalidade, seguindo as recomendações da 5ª Edição do Manual da Organização Mundial de Saúde (WHO, 2010) e para determinação da contagem total de espermatozoides progressivos (CTEP). A CTEP é obtida pela multiplicação do volume da ejaculação em mililitros pela concentração de espermatozoides e a proporção de espermatozoides com motilidade progressiva dividida por 100% (SMITH; RODRIQUEZ-RIGAU; STEINBERGER, 1977; AYALA *et al.*, 1996). Esse critério foi utilizado para caracterizar o grupo de pacientes subférteis ($CTEP \leq 1$ milhão) pois apresenta uma melhor correlação com a taxa de gravidez espontânea do que o sistema de classificação da OMS 2010 (HAMILTON *et al.*, 2015).

Após a realização do exame e cálculos de concentração, o restante da amostra foi lavado pela técnica “sperm-wash”, que consiste em adicionar o mesmo volume de meio HTF modificado com tampão HEPES e soro sintético substitutivo 10% Irvine Scientific (Santa Ana, CA-USA) (HTF-HEPES + SSS 10%) e centrifugar a 1000 rpm por 10 minutos. Após a primeira lavagem, o sobrenadante foi descartado e o pellet ressuscitado em 500 µl de HTF-HEPES + SSS 10%. Cada amostra foi então dividida em 3 alíquotas de 150 µl em microtubos estéreis (Corning, Axygen®) e após um novo ciclo de lavagem na centrífuga, o sobrenadante foi novamente descartado e do pellet resultante, contendo os espermatozoides, foram extraídos os lipídios que foram analisados por espectrometria de massas conforme os procedimentos descritos a seguir.

4.2.2. Extração lipídica e envio das amostras

As extrações lipídicas foram feitas seguindo o protocolo de Bligh & Dyer (1959) com pequenas modificações feitas a fim de adaptá-lo para células espermáticas. Após o preparo das amostras descrito acima, aos três pellets de cerca de 50 µl contendo os espermatozoides de cada amostra foram adicionados 200 µl de água ultrapura (MilliQ), em seguida, as amostras foram submetidas a três ciclos de congelamento em nitrogênio líquido e descongelamento manual com o objetivo de lisar as células espermáticas por meio de choques térmico e osmótico. Após essa etapa, foram adicionados os solventes metanol e clorofórmio (grau HPLC, 99,8%) à fração aquosa nos volumes de 450 e 250 µl, respectivamente. As amostras foram homogeneizadas e, após 15 minutos de descanso em temperatura ambiente, 200 µl de clorofórmio e água foram adicionados à solução, resultando em uma proporção de metanol/clorofórmio/água de 2:2:1.9, considerando que o volume aquoso intracelular dos espermatozoides humanos é de cerca de 60% (KLEINHANS et al., 1992). Em seguida, as amostras foram centrifugadas por 5 minutos a 5.000 x g, resultando na separação de duas fases líquidas e a formação de um disco sólido no centro (figura 4). A camada superior foi aspirada com o micropipetador e descartada, enquanto o conteúdo restante na camada inferior (contendo os lipídios) foi cuidadosamente aspirado e transferido para um segundo microtubo.

O restante de solventes na amostra foi evaporado com gás nitrogênio, inertizando as amostras. Para cada procedimento de extração também foi realizada uma extração “em branco”, que seguiu exatamente os mesmos passos, porém sem material biológico.

Os extratos lipídicos foram então armazenados no freezer a -80°C até a data de envio das amostras para análise. No dia do envio, as amostras foram embaladas à vácuo e seladas; o transporte até o Bindley Bioscience Mass Spectrometry Facility da Universidade de Purdue (EUA), foi feito via correio aéreo em temperatura ambiente.

Figura 4. Representação do método de extração lipídica de Bligh e Dyer.

Fonte: Adaptado de SÜNDERMANN; EGGERS; SCHWUDKE, 2016.

4.2.3. Preparo das amostras e ESI-MS

Para a análise no espectrômetro de massas, as amostras contendo os extratos lipídicos foram diluídas em solução de ACN + MeOH+300 mM NH₄Ac 3:6.65:0.35 (v/v). O grupo subfértil foi diluído na solução de estoque (1X), enquanto no grupo fértil foi utilizada uma diluição de 100X devido a diferença de concentração de espermatozoides entre as amostras (em média, 133 vezes maior nas amostras do grupo fértil) de modo a conter 1 milhão de espermatozoides em 30 µl de solvente (tabela 1). Um volume de 8 µl de cada amostra foi injetado em fluxo direto na fonte ESI do equipamento Agilent 6410 QQQ (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EUA) usando um microamostrador automático (G1367A). A bomba capilar conectada ao amostrador operava com um fluxo de 20 µL/min e uma pressão de 150 bar. A voltagem capilar no instrumento foi de 3,5 a 5 kV e o fluxo de gás foi de 5,1 L/min a 300 °C, de acordo com o estabelecido para a metodologia de perfilamento por MRM.

Tabela 1 - Identificação das amostras, concentração, e diluição utilizada para o grupo fértil.

Amostra (grupo fértil)	Conc./ml (x10⁶)	Conc. total (x10⁶)	Solvente (µl) (diluído 100x)
Fert_1	132	462	138.6
Fert_2	66.5	99.75	29.925
Fert_3	27	48.6	14.58
Fert_4	126	529.2	158.76
Fert_5	36	28.8	8.64
Fert_6	279	1534.5	460.35
Fert_7	109.5	76.5	22.95
Fert_8	77	154	46.2
Fert_9	53	212	63.6
Fert_10	55	181.5	54.45

Amostra (grupo subfértil)	Conc./ml (x10⁶)	Conc. total (x10⁶)	Solvente (µl)
Inf_1	0.4	0.92	30
Inf_2	0.3	0.27	30
Inf_3	1	4.4	132
Inf_4	0.5	1.8	30
Inf_5	2.4	6.24	187.2
Inf_6	2	7.8	234
Inf_7	0.3	0.66	30
Inf_8	0.2	1.02	30
Inf_9	0.1	0.35	30
Inf_10	0.6	1.5	45

4.2.4. MRM-profiling

Inicialmente, foram montadas listas de métodos (MRM) a partir da base de dados da plataforma online LipidMAPS. Como primeiro passo, montou-se uma lista contendo a m/z dos todos os lipídios de cada classe de interesse que foi, então, filtrada manualmente com base na literatura. Em seguida essas informações foram combinadas com a m/z típica dos fragmentos ou perda neutra (m/z neutro + íon precursor – fragmento típico) de cada classe lipídica selecionada (Tabela 2) para compor a lista final MRM que foram carregadas no equipamento.

Tabela 2 - Fragmento típico e perda neutra de cada classe lipídica.

Classe lipídica	Íon precursor	Fragmento típico	Referência
PC e SM	$[M+H]^+$	m/z 184	1,2
PE	$[M+H]^+$	Perda neutra de 141	1,2
PI	$[M+NH_4]^+$	Perda neutra de 277	1,2
PS	$[M+H]^+$	Perda neutra de 185	1,2
PG	$[M+NH_4]^+$	Perda neutra de 189	1,2
Sulfatídeos e seminolipídeos	$[M+H]^+$	m/z 97	3,4
TAG (16:0; 16:1; 18:0; 18:1; 18:2; 20:0; 20:4)	$[M+H]^+$	Perda neutra de 273; 271; 301; 299; 297; 329; 321	5

Fontes: 1. Brügger et al. (1997); 2. Taguchi et al. (2005); 3. Hsu e Turk (2004); 4. Kongmanas et al. (2010); 5. Murphy et al. (2007).

Após a etapa de preparo, a abordagem do perfilamento por MRM é dividida em mais duas etapas: “Discovery” e “Screening”. Na primeira, *pools* representativos de cada grupo (férteis e subférteis) foram analisados com base nas listas preparadas previamente e comparados com amostras “em branco”. Os lipídios das amostras biológicas que apresentaram intensidade de pelo 100 unidades a mais que o correspondente nas amostras “em branco” (*cutoff* determinado com base na sensibilidade do aparelho) foram selecionados e utilizados para compor novos métodos contendo apenas os lipídios presentes nas amostras. Na fase seguinte, as novas listas (ou métodos finais) foram utilizadas para interrogar o restante das amostras de maneira direcionada. A intensidade de cada espécie lipídica presente na lista foi registrada para cada amostra e o compilado dos dados foi analisado.

4.2.5. Processamento dos dados e análise estatística

Os valores de intensidade individual obtidos foram normalizados pela intensidade iônica total, em seguida, os dados foram analisados utilizando a plataforma MetaboAnalyst 4.0. (<http://www.metaboanalyst.ca>). Após o equilíbrio automático dos dados, o volcano plot (limiar de fold change = 1.5; p-valor = 0.05) foi aplicado para identificar as diferenças entre os grupos. A análise de componentes principais (PCA) e análise hierárquica aglomerativa por cluster foram utilizadas para explicar a variância no conjunto de dados. Foram considerados significativos estatisticamente valores de $p \leq 0.05$. A identificação e descrição biológica dos lipídios de interesse foram feitas com auxílio das plataformas METLIN e LipidMaps.

Resultados

5. Resultados

5.1. Padronização da técnica

Amostras de 6 pacientes foram usadas para testar o protocolo de extração de lipídica, e as condições de armazenamento e envio. Após a realização do espermograma e processo de lavagem, as 6 amostras de pacientes com perfis seminais distintos foram processadas seguindo o protocolo de Bligh & Dyer (1959) adaptado para células espermáticas previamente descrito. Os extratos lipídicos foram acondicionados em 3 frascos de vidro estéreis, sendo que um frasco continha extratos provenientes de uma única amostra, e outros dois continham *pools* de 2 e 3 amostras. As amostras foram inertizadas com gás nitrogênio e armazenadas à -80 °C por 1 mês até serem enviadas para análise por espectrometria de massas no Bindley Bioscience Mass Spectrometry Facility da Universidade de Purdue (EUA). Os espectros resultantes de uma análise de *full mass scan* e perfilamento de PC e SM (filtrando pelo fragmento m/z 184) comprovaram a eficácia da técnica de extração, bem como os protocolos de armazenamento e transporte de amostras inclusive para a amostra individual ao apresentar picos de intensidade nas massas de fosfolipídios conhecidos e esperados para esse tipo de amostra (figura 5).

Figura 5. Espectro resultante do perfilamento de PC e SM da amostra individual.

Fonte: Produção do autor.

Na etapa seguinte, amostras de pacientes subférteis foram coletadas e preparadas seguindo os mesmos protocolos de extração, armazenamento e envio previamente

estabelecidos, a fim de determinar a sensibilidade do equipamento para pequenas quantidades de espermatozoide. Mais uma vez foram realizadas análises de *full mass scan* e perfilamento de PC e SM, utilizando uma das amostras dos pacientes subférteis. Como o objetivo era testar a sensibilidade do aparelho, a amostra de menor concentração foi selecionada (amostra Inf_2C), que possuía inicialmente concentração total 0.27×10^6 espermatozoides. Uma das triplicatas utilizada foi ressuspensa em 20 μl de solvente, sendo que 8 μl foram injetados no espectrômetro. Os espectros novamente apresentaram picos de intensidade em valores de massa relativos a fosfolipídios, confirmando a capacidade do espectrômetro de processar amostras individuais. Os resultados também comprovaram a alta sensibilidade do aparelho para amostras contendo uma contagem muito baixa de espermatozoides, no caso, cerca de 36 mil células (figura 6).

Figura 6. Espectro de uma análise de perfilamento de PC e SM feito a partir de uma amostra de paciente subfértil.

Fonte: Produção do autor.

5.2. Fase “discovery”

A busca inicial na base de dados LipidMaps resultou em uma lista com 1760 lipídios dentro das 9 classes de interesse: fosfatidilcolina (PC), esfingomielina (SM), fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilinositol (PI), fosfatidilserina (PS), fosfatidilglicerol (PG), triacilglicerois (TAG) e sulfatídeos e seminolipídeos. Em seguida, durante um processo de filtragem manual, foram excluídos os lipídios com número ímpar de carbonos (que são raros

em animais devido a forma como são sintetizados), e os isômeros constitucionais (moléculas de mesmo peso, porém com conformações espaciais diferentes) foram combinados em um único item, permitindo uma redução considerável no tamanho da lista que passou de 1760 para 1287. Essa nova lista foi utilizada para investigar um *pool* representativo de cada grupo. Os extratos lipídicos de uma das triplicatas de amostras de 3 homens comprovadamente férteis (Fert_1A, Fert_2A, Fert_3A) e de 3 homens subférteis (Inf_1A, Inf_3A, Inf_ContA) foram analisados e comparados com um terceiro *pool* de amostras “em branco”.

Dos 1287 lipídios potencialmente presentes nos espermatozoides humanos, 417 apresentaram intensidade maior nas amostras biológicas em comparação com as amostras "em branco", uma redução de aproximadamente 67,5%, sendo a maioria das classes PC e SM (figura 7). Os 417 lipídios selecionados foram reorganizados em dois novos métodos direcionados que foram utilizados para interrogar individualmente as amostras na etapa seguinte.

Figura 7. A) Representação visual da quantidade de lipídios em cada classe antes e depois da etapa de "discovery".

Observa-se uma redução de aproximadamente 67,5%. Fonte: Produção do autor.

Figura 7. B) Distribuição dos MRMs selecionados por classe lipídica.

Distribuição dos MRMs selecionados nas classes lipídicas

Observa-se uma predominância das classes PC, SM e PE. Fonte: Produção do autor.

5.3. Fase “screening”

Extratos lipídicos obtidos a partir de espermatozoides de 10 pacientes comprovadamente férteis e 10 pacientes subférteis (totalizando 60 amostras, sendo que 6 foram utilizadas em etapas anteriores) foram analisados. Após a obtenção das intensidades de cada espécie lipídica, os valores foram novamente filtrados em relação as amostras “em branco” (foram selecionados os lipídios com intensidade máxima $> 30\%$ da intensidade observada na amostra “em branco”), e então normalizados pela contagem total de íons de cada amostra. Os 417 lipídios previamente selecionados foram organizados em dois métodos: M1 e M2; o primeiro contendo as informações de 240 lipídios das classes PC, SM e PE; e o segundo 175 das classes PG, PI, PS, TAG, sulfatídeos e seminolídeos. A subsequente análise estatística utilizou o volcano plot (limiar de fold change = 1.5; p-valor = 0,05) com o objetivo de comparar o perfil lipídico dos dois grupos. Foram identificados 162 lipídios diferencialmente expressos, sendo 105 deles no M1 e 57 no M2, (figura 8). Dos 105 lipídios com diferença entre os grupos no M1, 66 apresentaram maior intensidade no grupo dos férteis, enquanto 22 dos 57 identificados no M2 apresentaram o mesmo padrão, sugerindo uma relação da diferença observada com as classes lipídicas de cada método.

Para investigar a influência de cada classe na divisão dos grupos, os dados referentes a cada uma delas foram investigados individualmente utilizando os mesmos critérios previamente estabelecidos (tabela 3).

Tabela 3. Número de lipídios que apresentou intensidade relativa maior entre os grupos, separados por classe lipídica.

Classe lipídica	Férteis	Subférteis
PC	27	19
SM	2	16
PE	34	7
PG	1	3
PI	11	6
PS	10	7
Sulfolídeos	--	15
TAG	3	1

Valores considerados quando fold change > 1.5 e valor-p < 0.05 .

Como esperado, os resultados mostraram que as diferentes classes apresentaram uma divisão bastante clara entre os grupos avaliados, especialmente PE (que apresentou 82,93% dos lipídios com maior intensidade no grupo fértil), e SM, e Sulfolipídios (que apresentaram 88,89% e 100%, respectivamente, com maior intensidade no grupo subfértil).

Figura 8. Itens importantes selecionados pelo volcano plot nos métodos 1 e 2.

Volcano plot com limiar de fold change = 1.5 (x) e teste-t com p-valor = 0.05 (y) no M1 (cima) e M2 (baixo). Os pontos lilás representam os itens acima do limiar e se tornam mais significativos quanto mais distantes da posição 0,0. Os itens à direita são os mais abundantes no grupo dos férteis, e os à esquerda estão mais presentes no grupo dos subférteis. Fonte: Produção do autor.

Em seguida, foi realizada uma análise de componente principal (PCA). Nessa análise, destacaram-se as classes PC, SM, PG, e PS, que apresentaram uma separação praticamente completa em relação aos grupos de espermatozoides humanos provenientes de homens férteis ou subférteis. Nesses casos, os primeiros componentes explicaram juntos 55,9%, 63,6%, 81,4%, e 68,7%, respectivamente, da variação nas amostras como pode ser observado nos gráficos bidimensionais resultantes (figura 9).

Figura 9. Gráficos de análise de componentes principais 2D (PCA).

Os gráficos mostram a separação de (a) fosfatidilcolinas, (b) esfingomielinas, (c) fosfatidiletanolaminas, (d) fosfatidilgliceróis, (e) fosfatidilinositois, (f) fosfatidilserinas, (g) sulfolipídeos, e (g) triacilgliceróis presentes nos espermatozoides de homens férteis (vermelho) e subférteis (verde). Os dois primeiros componentes explicaram juntos 55,9% (a), 63,6% (b), 69,2% (c), 81,4% (d), 70,2% (e), 68,7% (f), 86,9% (g), e 61,1% (h) da variação nas amostras. Fonte: Produção do autor.

Uma análise hierárquica aglomerativa por cluster complementar das 25 espécies lipídicas mais significativas, selecionadas por meio de um teste-t (p -valor = 0.05), de cada uma das quatro classes foi realizada para confirmar a capacidade discriminativa dos dados obtidos e demonstrou clara divisão dos grupos estudados em relação as classes lipídicas com base em seu perfil, como pode ser observado nos heatmaps resultantes (figuras 10-12).

Como observado anteriormente, as PC e PS estão presente em maior intensidade no grupo fértil (18 e 15 dos 25 principais representantes da classe nas amostras, respectivamente). Além disso, em ambos os casos se nota uma subdivisão em relação ao número de saturações das moléculas. Nas PC, enquanto 4 dos 7 compostos mais expressos nas amostras do grupo subfértil são saturados (PC 40:0) ou monossaturados (PC 38:1; PC 36:1; PCo 38:1), apenas um dos 18 representantes do grupo fértil é saturado (PCo 38:0) (figura 10). Já nas PS, 6 dos 10 compostos mais expressos nas amostras do grupo subfértil tem no máximo uma insaturação, e apenas 2 dos 15 representantes do grupo fértil (figura 11).

Figura 10. Heatmap resultante da análise hierárquica aglomerativa por cluster representando o perfil das 25 fosfatidilcolinas mais relevantes.

Representação visual na forma de heatmap por código de cores resultante da análise hierárquica aglomerativa por cluster representando o perfil das 25 fosfatidilcolinas (y) mais abundantes em cada amostra (x), demonstrando a clara separação do grupo de homens férteis (vermelho) e subférteis (verde). Fonte: Produção do autor.

Figura 11. Heatmap resultante da análise hierárquica aglomerativa por cluster representando o perfil das 25 fosfatidilserinas mais relevantes.

Representação visual na forma de heatmap por código de cores resultante da análise hierárquica aglomerativa por cluster representando o perfil das 25 fosfatidilserinas (y) mais abundantes em cada amostra (x), demonstrando a clara separação do grupo de homens férteis (vermelho) e subférteis (verde).

No caso das SM, enquanto a quantidade numérica de compostos com maior intensidade em cada grupo é invertida em relação às PC (7 mais abundantes nos férteis *versus* 18 nos subférteis), a mesma tendência em relação ao número de insaturações é observada. São 8 compostos saturados mais presentes no grupo subfértil e nenhum no fértil (figura 12).

Figura 12. Heatmap resultante da análise hierárquica aglomerativa por cluster representando o perfil das 25 esfingomielinas mais relevantes.

Representação visual na forma de heatmap por código de cores resultante da análise hierárquica aglomerativa por cluster representando o perfil das 25 esfingomielinas (y) mais abundantes em cada amostra (x), demonstrando a clara separação do grupo de homens férteis (vermelho) e subférteis (verde).

Por fim, o perfil de fosfatidilgliceróis é menos claro em relação a divisão entre os grupos estudados, porém, a clara predominância das espécies PG 18:2, 18:3, e 18:4 no grupo subfértil e PG 34:1 no grupo fértil chama a atenção (figura 13).

Figura 13. Heatmap resultante da análise hierárquica aglomerativa por cluster representando o perfil dos 25 fosfatidilglicerois mais relevantes.

Representação visual na forma de heatmap por código de cores resultante da análise hierárquica aglomerativa por cluster representando o perfil dos 25 fosfoglicéris (y) mais abundantes em cada amostra (x), demonstrando a clara separação do grupo de homens férteis (vermelho) e subférteis (verde).

Discussão

6. Discussão

O foco das discussões e estudos sobre subfertilidade masculina comumente recai exclusivamente sobre os parâmetros analisados no espermograma: vitalidade, morfologia, concentração, e motilidade - e muitas vezes se desconecta do objetivo principal: alcançar uma gravidez (PAN et al., 2018). Esse cenário nos distancia de uma abordagem etiológica ao problema e, conseqüentemente, da busca por um tratamento (que atualmente se resume a tratamentos hormonais, intervenções cirúrgicas, e tecnologias de reprodução assistida). Por esse motivo, se tornam cada vez mais relevantes estudos que procuram compreender as origens da queda de fertilidade, ao mesmo tempo que propõem métodos diagnósticos alternativos (MORIN e SCOTT, 2018; SIMONI e SANTI, 2019). Alguns esforços nesse sentido incluem os estudos sobre a fragmentação do DNA espermático, o equilíbrio oxidativo, e a abordagem metabolômica: na qual se enquadra o estudo do papel dos lipídios, como é o caso do trabalho aqui apresentado.

Apesar do número crescente de publicações que relacionam os lipídios com a fertilidade masculina (63 artigos em 2010 *versus* 93 em 2019, com pico de 142 em 2017, segundo busca no PubMed utilizando as palavras-chave “lipid”, “male”, e “fertility”), até o momento apenas uma pequena porção objetivou caracterizar os perfis lipídicos de homens férteis e subférteis de maneira independente dos parâmetros seminais clássicos.

No presente estudo, um método de caracterização lipídica aperfeiçoado para a detecção de biomarcadores e desenvolvimento de abordagens diagnósticas, denominado MRM-profiling, foi aplicado pela primeira vez para investigar espermatozoides de homens comprovadamente férteis e subférteis. A inclusão dos participantes se pautou principalmente na comprovação da fertilidade por meio da confirmação de paternidade prévia e recente no caso do grupo de homens férteis, e da busca por reprodução assistida no Setor de Reprodução Humana do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto (HCRP) no caso dos subférteis. Além disso, no caso dos homens subférteis, foi feita uma seleção com base concentração total de espermatozoides progressivos ($CTEP \leq 1$ milhão), parâmetro que apresentou melhor correlação com a taxa de gravidez espontânea do que o sistema de classificação da OMS 2010 (HAMILTON et al., 2015), para garantir a influência do fator masculino, além de “nivelar por baixo” a sensibilidade da técnica aplicada.

A caracterização do perfil lipídico realizada na primeira etapa do estudo apontou a predominância de fosfatidilcolinas (PC) e esfingomielinas (SM), e fosfatidiletanolaminas (PE), que juntas totalizaram 241 (cerca de 57,8%) dos 417 lipídios encontrados nas amostras, proporção consistente com estudos anteriores (POULOS; WHITE, 1973; TAVILANI et al., 2007). Além disso, a análise permitiu a quantificação precisa de classes usualmente negligenciadas como fosfatidilinositois (PI), fosfatidilgliceriois (PG), fosfatidilserinas, e sulfolipídios (como sulfatideos e seminolipídeos), o que demonstra a eficácia do método

aplicado (LEBIG et al., 2004; FUCHS; SCHILLER, 2008). A comparação em relação ao número absoluto de lipídios detectados é dificultada pois, em sua maioria, os estudos de perfil lipídico espermático realizados apresentam os dados obtidos na forma de concentração (TAVILANI et al., 2007) ou caracterização dos lipídios mais abundantes (“fingerprinting”) (CAMARGO et al., 2014). Uma das poucas exceções é um estudo recente que comparou o perfil lipídico de 38 homens que atingiram ou não uma gravidez após um processo de reprodução assistida via injeção intracitoplasmática (ICSI) utilizando cromatografia líquida de ultra eficiência em associação com espectrometria de massas e identificou 151 espécies lipídicas distintas nas amostras (RIVERA-EGEA et al., 2019). A diferença observada no número de espécies detectadas provavelmente origina-se na diferença de perfil dos grupos estudados, uma vez que o estudo mencionado analisou apenas amostras de pacientes subférteis, e na sensibilidade das técnicas utilizadas. É importante ressaltar que as análises no espectrômetro de massas do presente estudo foram feitas de modo direto, ou seja, sem a necessidade de separação das classes lipídicas de interesse por cromatografia, o que atesta também quanto a eficiência da técnica em relação a otimização de tempo e recursos aplicados.

Em relação a comparação dos dois grupos, foram identificadas 162 espécies lipídicas com intensidades diferentes entre espermatozoides de homens férteis e subférteis. De maneira similar à comparação do número de lipídios identificados, a discussão dos dados obtidos com base nas espécies individuais é prejudicada pela escassez de trabalhos similares. Dentre os poucos trabalhos encontrados, está o trabalho previamente citado de Rivera-Egea et al. (2019) que identificou dez espécies lipídicas diferentes entre os espermatozoides de homens que atingiram ou não uma gravidez após ICSI, sendo que duas delas (SM d18:1/20:0 e SM d18:1/24:0) também apareceram no presente estudo. Notavelmente, ambas apresentaram maior intensidade no grupo que não atingiu a gravidez e no grupo de homens subférteis. Em outro estudo, apesar de terem realizado uma análise por espectrometria de massas indireta (LC-MS/MS), Engels et al. (2019) utiliza uma abordagem de investigação direcionada para comparar o perfil metabólico de sêmen e espermatozoides de homens saudáveis com perfis seminais variados. Foi observada uma correlação positiva entre 80% das SM e cerca de 50% das PC analisadas (dentre elas, PC 36:0, 36:5, 36:6, 38:5, 38:6, 40:2, 40:4, 40:5, 42:4, 42:5, e 42:6) com a capacidade de movimento progressiva dos espermatozoides. Além disso, o aumento na motilidade espermática também foi correlacionada com o aumento no grau de instauração das PC. Os resultados são altamente compatíveis com os reportados no presente estudo.

Além das PC e SM, as outras classes que melhor caracterizaram a diferença observada entre os perfis lipídicos de homens férteis e subférteis foram fosfatidilgliceróis, fosfatidilserinas, e os sulfolipídios. Curiosamente, observou-se que, com exceção das PC e PS, os lipídios diferencialmente expressos nas outras três classes apresentaram maior

intensidade nas amostras dos homens subférteis. A seguir, discutimos as possíveis origens e consequências da diferença observada.

A presença das PC na membrana do espermatozoide humano foi previamente correlacionada com uma boa motilidade espermática e capacidade de fertilização, enquanto a sua degradação aumentada e acúmulo dos produtos desse processo – principalmente LPC e ácidos graxos livres - foram associados com uma queda nesses parâmetros (GLANDER et al., 2002; ENGEL et al., 2019). A degradação da PC decorre de duas principais causas: a ação dependente de cálcio da enzima catalítica fosfolipase A2 (PLA); e pela ação de espécies reativas de oxigênio (ROS) em casos de stress oxidativo (GLANDER et al., 2002; PYTTEL et al., 2012). Pyttel et al. (2012) identificou uma diminuição na razão PC/LPC em espermatozoides de homens obesos, apesar do estudo não ter concluído se a origem desse aumento está relacionada à atividade da PLA ou das ROS, sabe-se que a obesidade pode acarretar em quadros de desequilíbrio oxidativo (OZATA et al., 2002), o que sugere que essa pode ser uma das causas da diferença nos níveis de PC, observadas no presente trabalho. O mesmo estudo de Pyttel et al. (2012) observaram também um aumento na intensidade de SM em espermatozoides de homens obesos.

Embora, assim como a PC, as esfingomielinas sejam essenciais para a correta composição da membrana celular espermática e desempenhem papel importante durante os processos de capacitação e reação acrossomal (ZANETTI et al. 2010), Butler et al. (2002) demonstrou que o acúmulo de SM em camundongos sem a enzima esfingomielinase ácida (ASM) causou deformações na peça intermediária da membrana espermática, afetando sua motilidade e fluidez, além de afetar negativamente a função mitocondrial dos espermatozoides. O modelo (*ASM-knock out*) foi utilizado para estudar a doença de Niemann-Pick, uma esfingolipidose rara que afeta a atividade da enzima em questão, mas esses achados podem ajudar a compreender as consequências do acúmulo de SM e outros lipídios nas membranas espermáticas.

A externalização das fosfatidilserinas nas membranas celulares é amplamente reconhecida como um indicador de apoptose (MARTIN et al., 2005), esse princípio é, inclusive, a base de uma tecnologia que remove espermatozoides apoptóticos de amostras seminais a fim de melhorar sua qualidade (de VANTÉRY ARRIGHI, 2009). No entanto, o processo de externalização (migração da camada interna para a camada externa da membrana celular) não explica a expressão aumentada dessa classe lipídica nas amostras de pacientes férteis. Sabe-se, porém, que as PS têm caráter anti-fusogênico e sua interação com o cálcio é essencial para permitir a eventos de fusão como o da fertilização (TARAFDAR et al., 2012).

Os fosfatidilgliceróis são conhecidos por constituírem a cardiolipina, um importante componente da membrana interna mitocondrial que tem papel fundamental em processos como a respiração e a troca energética (SAKAMOTO et al., 2012). Na maioria dos tecidos animais, os PG que compõem as cardiolipinas são que possuem cadeia de 18C, geralmente

com duas insaturações (SCHLAME; BRODY; HOSTETLER, 1993). Curiosamente, as espécies de PG com cadeia 18C encontradas nas amostras analisadas neste estudo foram encontradas em maior abundância no grupo subfértil, enquanto a espécie de cadeia muito longa PG 34:1 está presente em maior quantidade nas amostras do grupo fértil. O aumento da expressão de PG 34:1 foi documentado previamente em fibroblastos de pacientes da síndrome de MEGDEL, e associado a alterações no transporte de colesterol e da fosforilação oxidativa (WORTMANN et al., 2012). A informação sobre composição da cardiolipina e PG em geral nas células espermáticas é limitada, mas se sabe que a atividade mitocondrial é excepcionalmente intensa nos espermatozoides (MORAES; MEYERS, 2018), e talvez a presença de PG de cadeias mais longas tenham algum papel proteção contra o risco iminente de desequilíbrio oxidativo.

Sulfatídeos e seminolipídeos são sulfolipídios intimamente relacionados com apenas uma pequena diferença estrutural entre si. Ambos estão presentes nos espermatozoides humanos em pequenas quantidades, sendo que os seminolipídeos são exclusivos de células de espermatozoides de mamíferos, enquanto os sulfatídeos também são encontrados no sistema nervoso (TANPHAICHITR et al., 2018). Esses compostos são essenciais para a espermatogênese e também desempenham papel importante na adesão e sinalização celular através da sua participação na formação de *lipid rafts* (BOU KHALIL et al., 2006). Devido ao compartilhamento das suas vias de síntese e degradação, problemas de fertilidade com origem genética relacionada aos seminolipídeos podem ser também um sinal de problemas neuronais (TANPHAICHITR et al., 2018). Ademais, em razão da sua capacidade de adesão, seminolipídeos também são alvos para o ancoramento de micoplasmas, bactérias diminutas que já foram associadas com a infertilidade masculinas (LINGWOOD; SCHRAMAYR; QUINN, 1990). Apesar disso, não foi encontrada uma possível causa para a diferença observada na quantidade de sulfolipídeos entre os espermatozoides dos grupos avaliados. No entanto, a diferença foi bastante marcante, o que destaca esse grupo de lipídios como um dos principais alvos de estudos futuros.

Além da dificuldade de interpretação dos resultados devido ao número bastante limitados de trabalhos similares, o presente estudo apresenta outras limitações. Devido ao caráter do estudo – que envolveu a necessidade de voluntários para a doação de material seminal no caso dos homens férteis, o processo de obtenção das amostras desse grupo foi extremamente lento, totalizando 48 meses de diferença entre o envio das amostras de extratos lipídicos do grupo subfértil até o envio das últimas amostras do grupo fértil. Por esse motivo, existe a preocupação quanto a uma possível degradação das amostras mais antigas durante o armazenamento em freezer à -80 °C. Análises dos dados em relação à data de envio foram realizadas, mas não foram conclusivas (dados não divulgados). Embora a expressão aumentada nas amostras do grupo subfértil seja um indício de que o armazenamento não afetou a quantidade de lipídios, um estudo mais aprofundado sobre a taxa de oxidação de cada

classe lipídica estudada nas condições de armazenamento adotadas seria necessário para ter essa confirmação. Além disso, escolha por incluir no grupo de homens subférteis apenas homens com parâmetro seminal de oligospermia severa pode ter limitado a extrapolação dos dados para outros grupos, no entanto, a lista obtida na etapa de “discovery” a partir das amostras representativas servirá como base importante para estudos futuros.

Conclusões

7. Conclusões

O estudo demonstrou que a análise por ESI-MS associada ao método de MRM-profiling é uma abordagem bastante promissora para investigar a lipidômica de espermatozoides humanos, mesmo aqueles com parâmetros seminais considerados muito ruins, pois permitiu a avaliação do perfil lipídico dos gametas de maneira rápida e sensível, utilizando quantidades mínimas de amostra. Em conjunto com a validação dos protocolos de armazenamento e envio dos extratos lipídicos, pode-se considerar que foi dado um passo importante para a democratização da técnica.

O perfil lipídico de espermatozoides provenientes de homens férteis e subférteis foi caracterizado com sucesso e permitiu observar a ampla diferença entre os dois grupos, que confirma a relação dos lipídios espermáticos com a fertilidade masculina. As diferenças observadas foram consistentes com a literatura e contribuíram para a caracterização de classes lipídicas potencialmente envolvidas com os mecanismos associados à infertilidade. No entanto, serão necessários mais estudos utilizando essa mesma abordagem para detectar possíveis biomarcadores individuais, sendo que as classes lipídicas PC, SM, PS, e sulfolipídeos são apontadas como os principais alvos. A lista de 417 lipídios detectados tem grande valor e poderá servir como base para estudos futuros.

*Referências*³

³ De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT 6023)

Referências

- ACTON, B. M. et al. Alterations in mitochondrial membrane potential during preimplantation stages of mouse and human embryo development. *Mol Hum Reprod*. 2004 Jan;10(1):23-32.
- AEBERSOLD, R.; MANN, M. Mass spectrometry-based proteomics. *Nature*. 2003 Mar 13;422(6928):198-207.
- AITKEN, R. J. et al. Multiple forms of redox activity in populations of human spermatozoa. *Molecular Human Reproduction* 2003;9 645–661.
- AITKEN, R. J. et al. Oxidative stress and male reproductive health. *Asian J Androl* 2014;16:31-8.
- AITKEN, R. J.; BAKER, M. A. Oxidative stress, sperm survival and fertility control. *Molecular and Cellular Endocrinology* 2006;250 66–69.
- AITKEN, R. J.; CLARKSON, J.S.; FISHEL, S. Generation of reactive oxygen species, lipid peroxidation, and human sperm function. *Biol Reprod* 1989;41:183-97.
- AITKEN, R. J.; KRAUSZ, C. Oxidative stress, DNA damage and the Y chromosome. *Reproduction* 2001; 122:497–506.
- AKSOY, Y. et al. Sperm fatty acid composition in subfertile men. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2006 Aug;75(2):75-9.
- ALAHMAR, A. T. Role of oxidative stress in male infertility: An updated review. *J Hum Reprod Sci* 2019;12:4-18.
- AYALA, C.; STEINBERGER, E.; SMITH, D. P. The influence of semen analysis parameters on the fertility potential of infertile couples. *J Androl* 1996; 17:718 – 725.
- BALDWIN, M.A. Modern mass spectrometry in bio-organic analysis. *Nat. Prod. Rep.*, 1995. 12: p33–44.
- BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol*. 1959 Aug;37(8):911-7.
- BORGES, E. JR. et al. Total motile sperm count has a superior predictive value over the WHO 2010 cut-off values for the outcomes of intracytoplasmic sperm injection cycles. *Andrology*. 2016 Sep;4(5):880-6. doi: 10.1111/andr.12199.
- BOU KHALIL, M. et al. Sperm capacitation induces an increase in lipid rafts having zona pellucida binding ability and containing sulfogalactosylglycerolipid. *Developmental biology*. 2006;290(1):220-35.
- BRESLER, K. et al. Parameters affecting the accuracy of the MALDI-TOF MS determination of the phosphatidylcholine/lysophosphatidylcholine (PC/LPC) ratio as potential marker of spermatozoa quality. *Chemistry and physics of lipids*. 2011 Oct 1;164(7):696-702.

- BRÜGGER, B. et al. Quantitative analysis of biological membrane lipids at the low picomole level by nano-electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997 Mar 18;94(6):2339-44.
- BUTLER, A. et al. Reproductive Pathology and Sperm Physiology in Acid Sphingomyelinase-Deficient Mice. *The American Journal of Pathology*. 2002;161(3):1061-75.
- CAMARGO, M. et al. Maldi-tof fingerprinting of seminal plasma lipids in the study of human male infertility. *Lipids*. 2014;49(9):943-56.
- CATES, W.; FARLEY, T. M.; ROWE, P. J. Worldwide patterns of infertility: is Africa different? *Lancet* 1985; 2:596–598.
- CORDEIRO, F. B. et al. Multiple reaction monitoring (MRM)-profiling for biomarker discovery applied to human polycystic ovarian syndrome. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 2017 Sep 15;31(17):1462-1470.
- de Lima, C.B. et al. Comprehensive lipid profiling of early stage oocytes and embryos by MRM profiling. *Journal of Mass Spectrometry*. 2018 Dec;53(12):1247-52.
- DE VANTERY ARRIGHI, C. et al. Removal of spermatozoa with externalized phosphatidylserine from sperm preparation in human assisted medical procreation: effects on viability, motility and mitochondrial membrane potential. *Reproductive biology and endocrinology : RB&E*. 2009;7:1.
- ENGEL, K. M. et al. Metabolomic profiling reveals correlations between spermiogram parameters and the metabolites present in human spermatozoa and seminal plasma. *PLoS One*. 2019 Feb 20;14(2):e0211679.
- FERREIRA, C. R. Chemical profiling of cerebrospinal fluid by multiple reaction monitoring mass spectrometry. *Analyst*. 2016 Sep 21;141(18):5252-5.
- FERREIRA, C. R. et al. Proteomics, metabolomics and lipidomics in reproductive biotechnologies: the MS solutions. *Acta Scientiae Veterinariae*. 2010;38:s591-603.
- FLESCHE, F. M.; GADELLA, B. M. Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. *Biochim Biophys Acta*. 2000 Nov 10;1469(3):197-235.
- FORCE, A. et al. Membrane fluidity and lipid content of human spermatozoa selected by swim-up method. *Int J Androl*. 2001 Dec;24(6):327-34.
- FUCHS, B. et al. MALDI-TOF "fingerprint" phospholipid mass spectra allow the differentiation between ruminantia and feloideae spermatozoa. *Theriogenology*. 2009 Mar 1;71(4):568-75.
- FUCHS, B.; SCHILLER, J. MALDI-TOF MS analysis of lipids from cells, tissues and body fluids. *Subcell Biochem*. 2008;49:541-65.

- GARDNER, D. K. et al. Textbook of Assisted Reproductive Techniques, 4th ed. (Two Volume Set). CRC Press. 2012.
- GILLETTE, M. A.; CARR, S. A. Quantitative analysis of peptides and proteins in biomedicine by targeted mass spectrometry. *Nat Methods*. 2013 Jan;10(1):28-34.
- GLANDER, H. J. et al. Deterioration of spermatozoal plasma membrane is associated with an increase of sperm lyso-phosphatidylcholines. *Andrologia* 2002 June;34(6): 360-366.
- GRIVEAU, J. F.; LE LANNOU, D. Reactive oxygen species and human spermatozoa: physiology and pathology. *Int J Androl* 1997; 20:61–69.
- HAMADA, A, et al. Unexplained male infertility: diagnosis and management. *Int Braz J Urol*. 2012 Sep-Oct;38(5):576-94.
- HAMILTON, J. A. et al. Total motile sperm count: a better indicator for the severity of male factor infertility than the WHO sperm classification system. *Hum Reprod*. 2015 May;30(5):1110-21.
- HSU, F. F.; TURK, J. Studies on sulfatides by quadrupole ion-trap mass spectrometry with electrospray ionization: structural characterization and the fragmentation processes that include an unusual internal galactose residue loss and the classical charge-remote fragmentation. *J Am Soc Mass Spectrom*. 2004 Apr;15(4):536-46.
- JAROW, J. P. et al. Best practice policies for male infertility. *J Urol* 2002; 167:2138–2144.
- KAWANO, N. et al. Lipid rafts: keys to sperm maturation, fertilization, and early embryogenesis. *Journal of lipids*, 2011.
- KLEINHANS, F. W. Measurement of human sperm intracellular water volume by electron spin resonance. *J Androl*. 1992 Nov-Dec;13(6):498-506.
- KONGMANAS, K. et al. Quantification of seminolipid by LC-ESI-MS/MS-multiple reaction monitoring: compensatory levels in Cgt(+/-) mice. *J Lipid Res*. 2010 Dec;51(12):3548-58.
- LENZI, A. et al. Lipids of the sperm plasma membrane: from polyunsaturated fatty acids considered as markers of sperm function to possible scavenger therapy. *Hum Reprod Update*. 1996 May-Jun;2(3):246-56.
- LESSIG, J. et al. Analysis of the lipid composition of human and boar spermatozoa by MALDI-TOF mass spectrometry, thin layer chromatography and ³¹P NMR spectroscopy. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*. 2004 Feb;137(2):265-77.
- LEWIS, S. E. Is sperm evaluation useful in predicting human fertility? *Reproduction*. 2007 Jul;134(1):31-40.
- LINGWOOD, C.; SCHRAMAYR, S.; QUINN, P. Male germ cell specific sulfogalactoglycerolipid is recognized and degraded by mycoplasmas associated with male infertility. *J Cell Physiol*. 1990 Jan;142(1):170-6.

LOVERN, J. A.; OLLEY, J. The lipids of ram spermatozoa. *Biochem J.* 1957 Dec; 67(4): 630–643.

MARTIN, G. et al. Phosphatidylserine externalization in human sperm induced by calcium ionophore A23187: relationship with apoptosis, membrane scrambling and the acrosome reaction. *Human reproduction.* 2005;20(12):3459-68.

MORAES, C. R.; MEYERS, S. The sperm mitochondrion: Organelle of many functions. *Animal reproduction science.* 2018 Jul 1;194:71-80.

MORIN, S. J.; SCOTT, R. T. Knowledge gaps in male infertility: a reproductive endocrinology and infertility perspective. *Translational andrology and urology.* 2018;7(Suppl 3):S283-S91.

MURPHY, R. C. et al. Detection of the abundance of diacylglycerol and triacylglycerol molecular species in cells using neutral loss mass spectrometry. *Anal Biochem.* 2007 Jul 1;366(1):59.

NASCIMENTO FILHO, E. G. Utilização do monitoramento de reações múltiplas para quantificação de produtos de interesse biotecnológico. 2016. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

NIESCHLAG, E. Classification of andrological disorders. In: Nieschlag E, Behre HM, editors. *Andrology: male reproductive health and dysfunction.* 2nd ed. Berlin: Springer; 2000.

NIMPTSCH, A. et al. A MALDI MS investigation of the lysophosphatidylcholine/phosphatidylcholine ratio in human spermatozoa and erythrocytes as a useful fertility marker. *Lipids.* 2014 Mar;49(3):287-93.

OZATA, M. et al. Increased oxidative stress and hypozincemia in male obesity. *Clinical Biochemistry* 2002;35, 627–631.

PAN, M. M., et al. Male Infertility Diagnosis and Treatment in the Era of In Vitro Fertilization and Intracytoplasmic Sperm Injection. *Med Clin North Am* 2018;**102**(2): 337-347.

PETKOVIC, M. et al. Detection of individual phospholipids in lipid mixtures by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry: phosphatidylcholine prevents the detection of further species. *Anal Biochem.* 2001 Feb 15;289(2):202-16.

POULOS, A.; WHITE, I. G. The phospholipid composition of human spermatozoa and seminal plasma. *J Reprod Fertil.* 1973 Nov;35(2):265-72.

PYTTEL, S. et al. Enhanced lysophosphatidylcholine and sphingomyelin contents are characteristic of spermatozoa from obese men-A MALDI mass spectrometric study. *Chem Phys Lipids.* 2012 Dec;165(8):861-5.

- RIVERA-EGEA, R. Sperm lipidic profiles differ significantly between ejaculates resulting in pregnancy or not following intracytoplasmic sperm injection. *J Assist Reprod Genet.* 2018 Nov;35(11):1973-1985.
- SAKAMOTO, T. et al. Deficiency of cardiolipin synthase causes abnormal mitochondrial function and morphology in germ cells of *Caenorhabditis elegans*. *J Biol Chem.* 2012 Feb 10;287(7):4590-601.
- SCHILLER, J. et al. Analysis of the lipid composition of bull spermatozoa by MALDI-TOF mass spectrometry--a cautionary note. *Chem Phys Lipids.* 2003 Nov;126(1):85-94.
- SCHILLER, J. Lipid analysis of human spermatozoa and seminal plasma by MALDI-TOF mass spectrometry and NMR spectroscopy - effects of freezing and thawing. *Chem Phys Lipids.* 2000 Aug;106(2):145-56.
- SCHLAME, M.; BRODY, S.; HOSTETLER, K. Y. Mitochondrial cardiolipin in diverse eukaryotes. Comparison of biosynthetic reactions and molecular acyl species. *Eur J Biochem.* 1993 Mar 15;212(3):727-35.
- SIMONI, M.; SANTI, D. FSH treatment of male idiopathic infertility: Time for a paradigm change. 2019. *Andrology*.
- Singh, N. P.; Muller, C. H.; Berger, R. E. Effects of age on DNA double-strand breaks and apoptosis in human sperm. *Fertil Steril.* 2003 Dec;80(6):1420-30.
- SMITH, K. D.; RODRIQUEZ-RIGAU, L. J.; STEINBERGER, E. Relation between indices of semen analysis and pregnancy rate in infertile couples. *Fertil steril* 1977; 28:1314 – 1319.
- SÜNDERMANN, A.; EGGERS, L. F.; SCHWUDKE, D. (2016) Liquid Extraction: Bligh and Dyer. In: Wenk M. (eds) *Encyclopedia of Lipidomics*. Springer, Dordrecht.
- TAGUCHI, R. et al. Focused lipidomics by tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2005 Aug 25;823(1):26-36.
- TANPHAICHITR, N. et al. Properties, metabolism and roles of sulfogalactosylglycerolipid in male reproduction. *Progress in lipid research.* 2018;72:18-41.
- TARAFDAR, P. K. et al. Phosphatidylserine inhibits and calcium promotes model membrane fusion. *Biophysical journal.* 2012;103(9):1880-9.
- TAVILANI, H. et al. Lipid composition of spermatozoa in normozoospermic and asthenozoospermic males. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 2007 Jul;77(1):45-50.
- TOSHIMORI, K.; EDDY, E. M. The Spermatozoon. In: Plant, T. M.; Zeleznik, A. J. (Eds.), *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*. 4th ed. Amsterdam: Academic Press, 2013. p. 99–148.
- WHO. Report of the meeting on the prevention of infertility at the primary health care level. Geneva: World Health Organization; 1984.

WHO. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. (5th ed) Geneva: World Health Organization; 2010.

WORTMANN, S. B. et al. Mutations in the phospholipid remodeling gene SERAC1 impair mitochondrial function and intracellular cholesterol trafficking and cause dystonia and deafness. *Nat Genet.* 2012 Jun 10;44(7):797-802.

YANNELL, K. E. et al. Multiple reaction monitoring (MRM)-profiling with biomarker identification by LC-QTOF to characterize coronary artery disease.

YEAGLE, P. L. (Ed.). *The Structure of Biological Membranes*. CRC Press. Boca Raton, Florida: CRC Press, 2005.

ZANETTI, S. R. et al. Differential involvement of rat sperm choline glycerophospholipids and sphingomyelin in capacitation and the acrosomal reaction. *Biochimie.* 2010;92(12):1886-94.

ZEGERS-HOCHSCHILD, F. et al. International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology (ICMART) and the World Health Organization (WHO) revised glossary of ART terminology, 2009. *Fertil Steril.* 2009 Nov;92(5):1520-4.

Anexos

Anexos

Anexo 1 – Aprovação da CEP

Considerações Finais a critério do CEP:

Projeto Aprovado: Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados ao CEP, relatórios parciais anuais referentes ao andamento da pesquisa e relatório final ao término do trabalho. Qualquer modificação do projeto original deve ser apresentada a este CEP em nova versão, de forma objetiva e com justificativas, para nova apreciação.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1110122.pdf	22/06/2018 00:21:04		Aceito
Outros	CartaRespostaParecerProjetoEBV3.pdf	22/06/2018 00:18:54	EDUARDO DOMINGOS	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLEPacientesInferteisEBv3.pdf	22/06/2018 00:16:40	EDUARDO DOMINGOS BORGES	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLEPacientesFerteisEBv3.pdf	22/06/2018 00:16:22	EDUARDO DOMINGOS BORGES	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projetodetalhadoEBv3.pdf	22/06/2018 00:15:58	EDUARDO DOMINGOS BORGES	Aceito
Outros	CartaRespostaParecerProjetoEB.pdf	22/05/2018 18:16:39	EDUARDO DOMINGOS	Aceito

Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projetodetalhadoEBv2.pdf	22/05/2018 18:16:09	EDUARDO DOMINGOS BORGES	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLEPacientesInferteisEBv2.pdf	22/05/2018 18:15:45	EDUARDO DOMINGOS BORGES	Aceito
TCLE / Termos de	TCLEPacientesFerteisEBv2.pdf	22/05/2018	EDUARDO	Aceito

Página 04 de

Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLEPacientesFerteisEBv2.pdf	18:15:29	DOMINGOS BORGES	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projetodetalhadoEB.pdf	14/05/2018 15:42:20	EDUARDO DOMINGOS BORGES	Aceito
Cronograma	cronogramaEB.pdf	14/05/2018 15:41:49	EDUARDO DOMINGOS	Aceito
Folha de Rosto	folhaderostoEB.pdf	11/05/2018 15:07:23	EDUARDO DOMINGOS	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	AprovacaoCPEB.PDF	10/05/2018 14:02:50	EDUARDO DOMINGOS BORGES	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLEPacientesInferteisEB.pdf	10/05/2018 14:01:10	EDUARDO DOMINGOS BORGES	Aceito

TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLEPacientesFerteisEB.pdf	10/05/2018 14:01:00	EDUARDO DOMINGOS BORGES	Aceito
Orçamento	OrcamentoeAprovacaoDeclEB.pdf	10/05/2018 14:00:24	EDUARDO DOMINGOS	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

RIBEIRAO PRETO, 02 de Julho de 2018

Assinado por:
MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA
(Coordenador)

Anexo 2 – TCLE**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE ESCLARECIDO****Pacientes Inférteis**

Você está sendo convidado como voluntário a participar da pesquisa cujo título é:
“Caracterização e comparação dos perfis lipídicos de espermatozoides de homens férteis e homens inférteis com baixa concentração de espermatozoides progressivos”.

A justificativa, os objetivos e os procedimentos: Para funcionar corretamente, o espermatozoide precisa ter a membrana que o envolve em perfeito estado. O estudo dos componentes da membrana é muito importante para compreender diversas doenças que podem afetar o espermatozoide. As características da membrana espermática são determinadas principalmente pelos lipídios que nela estão presentes. Esses lipídios têm papel muito importante na integridade, fluidez, e permeabilidade das membranas e isso influencia diretamente na capacidade do espermatozoide de se movimentar e resistir ao processo de congelamento, por exemplo. No entanto, até hoje uma comparação entre os lipídios presentes no sêmen de homens férteis e homens com sinais de infertilidade ainda não foi feita usando uma técnica apropriada. Portanto, no estudo que realizaremos, temos o objetivo de caracterizar o perfil lipídico de espermatozoides de homens férteis e homens subférteis usando uma técnica de espectrometria de massas por electrospray (ESI-MS) e então compará-los afim de identificar possíveis marcadores da fertilidade comprometida. A sua participação neste estudo consistiria em fornecer uma alíquota do sêmen que você irá colher hoje, no Laboratório de Ginecologia e Obstetrícia, para a realização do seu espermograma, que foi solicitado para avaliar a sua qualidade seminal. Habitualmente, uma alíquota do sêmen é usada para fazer o espermograma e o restante é descartado. Desta forma, pedimos que doe a alíquota que seria descartada, para ser utilizada no presente estudo. Esta alíquota passará por um processo para que os lipídios nela presente sejam separados e então analisados para descobrir sua possível relação com a qualidade dos espermatozoides.

Desconforto e riscos: A participação neste estudo não promove qualquer desconforto ou risco, pois apenas prevê a doação de parte da amostra seminal coletada para outra finalidade (realização do espermograma) para uso no presente estudo, após o que será totalmente descartada, seguindo as normas de biossegurança.

Garantia de esclarecimento, liberdade de recusa, e garantia de sigilo: Você será esclarecido sobre a pesquisa em qualquer aspecto que desejar. Você é livre para recusar-se a participar, retirar seu consentimento ou interromper a participação a qualquer momento. A sua participação é voluntária e a recusa em participar não irá acarretar qualquer penalidade ou perda de benefícios. O pesquisador irá tratar a sua identidade com padrões profissionais de sigilo. Os resultados de exames porventura realizados serão enviados para você e permanecerão confidenciais. Você não será identificado em nenhuma publicação que possa resultar deste estudo. Uma cópia deste consentimento informado será arquivada no Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo e outra será fornecida a você.

Custos da participação, ressarcimento e indenização por eventuais danos: A participação no estudo não acarretará custos para você e não será disponibilizada nenhuma compensação financeira adicional.

Benefícios diretos e indiretos: A participação neste estudo não trará qualquer benefício direto a você. Como benefício indireto, estará ajudando a aprofundar os estudos sobre características importantes dos gametas masculinos, o que pode melhorar a eficiência de técnicas de reprodução assistida.

Declaração do participante:

Eu, _____ fui informado dos objetivos da pesquisa acima de maneira clara e detalhada e esclareci minhas dúvidas. Sei que em qualquer momento poderei solicitar novas informações e modificar minha decisão se assim o desejar. Os pesquisadores Paula Andrea Navarro e/ou Eduardo Borges certificaram-me de que todos os dados desta pesquisa serão confidenciais. Em caso de dúvidas poderei chamar a pesquisadora Paula Andrea Navarro e/ou Eduardo Borges no telefone (16) 3602-2816; procurá-los diretamente Laboratório de Ginecologia e Obstetrícia, sito à avenida Bandeirantes, 3900, Campus Universitário da USP, 1º andar, Ribeirão Preto, SP; ou o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas a Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, situado na Avenida dos Bandeirantes, 3900, Campus Universitário da USP, subsolo, Ribeirão Preto, SP e encontrado no telefone (16) 3602-2228. Declaro que concordo em participar desse estudo. Recebi uma cópia deste termo de consentimento livre e esclarecido e me foi dada a oportunidade de ler e esclarecer as minhas dúvidas.

Nome	Assinatura do Participante	Data
------	----------------------------	------

Nome	Assinatura do Pesquisador	Data
------	---------------------------	------

Nome	Assinatura da Testemunha	Data
------	--------------------------	------

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE ESCLARECIDO

Pacientes Férteis

Você está sendo convidado como voluntário a participar da pesquisa cujo título é:

“Caracterização e comparação dos perfis lipídicos de espermatozoides de homens férteis e homens inférteis com baixa concentração de espermatozoides progressivos”.

A justificativa, os objetivos e os procedimentos: Para funcionar corretamente, o espermatozoide precisa ter a membrana que o envolve em perfeito estado. O estudo dos componentes da membrana é muito importante para compreender diversas doenças que podem afetar o espermatozoide. As características da membrana espermática são determinadas principalmente pelos lipídios que nela estão presentes. Esses lipídios têm papel muito importante na integridade, fluidez, e permeabilidade das membranas e isso influencia diretamente na capacidade do espermatozoide de se movimentar e resistir ao processo de congelamento, por exemplo. No entanto, até hoje uma comparação entre os lipídios presentes no sêmen de homens férteis e homens com dificuldades para engravidar (subférteis ou inférteis) ainda não foi feita usando uma técnica apropriada. Portanto, no estudo que realizaremos, temos o objetivo de caracterizar o perfil lipídico de espermatozoides de homens férteis e homens subférteis usando uma técnica de espectrometria de massas por electrospray (ESI-MS) e então compará-los afim de identificar possíveis marcadores da fertilidade comprometida. A sua participação neste estudo consistiria em fornecer uma amostra de sêmen que você colherá hoje na sala de Coleta Seminal do Laboratório de Ginecologia e Obstetrícia, localizado no primeiro andar do HC, para a realização do seu espermograma (análise da qualidade seminal) e o restante passará por um processo para que os lipídios nela presente sejam separados e então analisados para caracterizar o perfil de lipídios dos espermatozoides de homens férteis. Esta caracterização é importante no sentido de avaliarmos se o perfil de lipídios de homens férteis, como você, é diferente do de homens inférteis, o que pode contribuir para o entendimento de quais alterações lipídicas poderiam estar relacionadas a infertilidade masculina.

Desconforto e riscos: A participação neste estudo não promove qualquer desconforto ou risco, pois apenas prevê a doação de amostra seminal coletada na sala de Coleta Seminal do Laboratório de Ginecologia e Obstetrícia para uso no presente estudo, após o que será totalmente descartada, seguindo as normas de biossegurança.

Garantia de esclarecimento, liberdade de recusa, e garantia de sigilo: Você será esclarecido sobre a pesquisa em qualquer aspecto que desejar. Você é livre para recusar-se a participar, retirar seu consentimento ou interromper a participação a qualquer momento. A sua participação é voluntária e a recusa em participar não irá acarretar qualquer penalidade ou perda de benefícios. O pesquisador irá tratar a sua identidade com padrões profissionais de sigilo. Os resultados de exames porventura realizados serão enviados para você e permanecerão confidenciais. Você não será identificado em nenhuma publicação que possa resultar deste estudo. Uma cópia deste consentimento informado será arquivada no Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo e outra será fornecida a você.

Custos da participação, ressarcimento e indenização por eventuais danos: A participação no estudo não acarretará custos para você e não será disponibilizada nenhuma compensação financeira adicional.

Benefícios diretos e indiretos: A participação neste estudo não trará qualquer benefício direto a você. Como benefício indireto, estará ajudando a aprofundar os estudos sobre características importantes dos gametas masculinos, o que pode melhorar a eficiência de técnicas de reprodução assistida.

Declaração do participante:

Eu, _____ fui informado dos objetivos da pesquisa acima de maneira clara e detalhada e esclareci minhas dúvidas. Sei que em qualquer momento poderei solicitar novas informações e modificar minha decisão se assim o desejar. Os pesquisadores Paula Andrea Navarro e/ou Eduardo Borges certificaram-me de que todos os dados desta pesquisa serão confidenciais. Em caso de dúvidas poderei chamar a pesquisadora Paula Andrea Navarro e/ou Eduardo Borges no telefone (16) 3602-2816; procurá-los diretamente Laboratório de Ginecologia e Obstetrícia, sito à avenida Bandeirantes, 3900, Campus Universitário da USP, 1º andar, Ribeirão Preto, SP; ou o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas a Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, situado na Avenida dos Bandeirantes, 3900, Campus Universitário da USP, subsolo, Ribeirão Preto, SP e encontrado no telefone (16) 3602-2228. Declaro que concordo em participar desse estudo. Recebi uma cópia deste termo de consentimento livre e esclarecido e me foi dada a oportunidade de ler e esclarecer as minhas dúvidas.

Nome	Assinatura do Participante	Data
------	----------------------------	------

Nome	Assinatura do Pesquisador	Data
------	---------------------------	------

Nome	Assinatura da Testemunha	Data
------	--------------------------	------