

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

Marília Alves Caetano

Caracterização lipídica de espermatozoides de homens férteis e homens
inférteis com oligoastenozoospermia

Ribeirão Preto

2023

MARÍLIA ALVES CAETANO

Caracterização lipídica de espermatozoides de homens férteis e homens inférteis com oligoastenozoospermia

Versão corrigida. A versão original encontra-se disponível tanto na Biblioteca da Unidade que aloja o Programa, quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Ginecologia e Obstetrícia.

Orientadora: Professora Doutora Paula Andrea de Albuquerque Salles Navarro.

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

Caetano, Marília Alves

Caracterização lipídica de espermatozoides de homens férteis e homens inférteis com oligoastenozoospermia. Ribeirão Preto, 2023.

62 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. Cromatografia líquida

Marília Alves Caetano

Caracterização lipídica de espermatozoides de homens férteis e homens inférteis com oligoastenozoospermia.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

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, Júlio e Eliandra, pelo apoio incondicional e por acreditarem na minha capacidade de realizar meus sonhos.

Agradecimentos

À minha orientadora, Prof^ª. Dra. Paula Andrea de Albuquerque Salles Navarro, pela dedicação ao projeto e confiança no meu trabalho mesmo nos momentos que deixei de acreditar.

À minha irmã, Camila, por nunca medir esforços para estar por perto e sempre me apoiar nas minhas decisões com muito carinho.

Ao meu companheiro de vida, Vinício, que esteve ao meu lado nos momentos bons e ruins, e me ajudou a passar por eles de forma branda e com amor.

Ao meu filhotinho Bento, por toda paz e serenidade que me traz com sua doçura e amor incondicional.

À Suelen e Fabi, que foram uma base de apoio muito importante nessa fase da minha vida e se tornaram grandes amigas que levarei para a vida toda.

À Cris e Cidinha que além de me acompanharem em todos os meus desafios de laboratório com paciência e sabedoria, me presentearam com suas palavras amigas deixando meus dias mais leves e divertidos.

À Juliana Meola e Carol Mantovani, por estarem sempre dispostas a me ajudar em tudo que eu precisasse com carinho e amizade.

Ao Murilo que se fez presente durante o desenvolvimento do projeto e não mediu esforços para me ajudar, e ao Eduardo que sempre me auxiliou prontamente.

À Caroline, por sua amizade de longa data que só se fortalece com o passar dos anos.

À secretaria de pós graduação pelo auxílio administrativo e a equipe de funcionários do Laboratório de Ginecologia e Obstetrícia, Setor de Reprodução Humana, do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, pelo apoio técnico prestado.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001

Resumo

CAETANO, Marília Alves. **Caracterização lipídica de espermatozoides de homens férteis e homens inférteis com oligoastenozoospermia**. 62 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2023.

Os lipídios desempenham um papel fundamental na membrana plasmática do espermatozoide, ajudando a manter sua integridade estrutural, funcionalidade e estão diretamente relacionados ao processo de capacidade de fertilização. Apesar de sua relevância, as informações sobre o perfil lipídico das células espermáticas humanas são limitadas. Sendo assim, o principal objetivo desse estudo foi realizar a caracterização lipídica de espermatozoides de homens férteis e homens inférteis com oligoastenozoospermia por meio da técnica de cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (LC-MS/MS) e o perfilamento por monitoramento de reações múltiplas (MRM). Foi realizado um estudo prospectivo observacional onde extratos lipídicos de amostras seminais de 10 homens férteis e 10 homens inférteis foram analisados. A extração lipídica foi feita através do protocolo de Bligh & Dyer adaptado para espermatozoides e armazenados a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ até a data de envio para análise. As amostras foram enviadas via correio terrestre em temperatura ambiente após selagem a vácuo. A eficiência do processo de extração e envio foi confirmada por uma análise inicial realizada em um pool das amostras. A primeira etapa do método de transições MRM detectou a presença de 15 tipos de lipídios presentes nas amostras (a partir de uma seleção inicial de 66 metabólitos feita em bases de dados). A análise estatística dos dados obtidos na segunda etapa identificou 9 lipídios diferencialmente expressos entre os dois grupos, representados por 6 fosfolipídios (PC) e 3 esfingomielinas (SM), estando em maior abundância no grupo infértil, corroborando a relação existente entre lipídios espermáticos e a fertilidade masculina. O estudo evidencia que a padronização das técnicas de extração lipídica, armazenamento, envio dos extratos lipídicos, LC-MS/MS e transições MRM possibilitou a análise lipídica gamética de maneira rápida e sensível, utilizando pequenas quantidades de amostra. Com a exceção da PC (38:5), que foi previamente associada a uma maior fertilidade em estudos anteriores, todas as diferenças observadas foram consistentes com a literatura e contribuíram para uma melhor análise dos lipídios envolvidos com a infertilidade. Mais estudos utilizando essa mesma abordagem serão necessários para detectar possíveis biomarcadores individuais, sendo que as espécies lipídicas detectadas neste estudo (PC(34:0); PC (16:0); PC (34:2); PC (28:1); PC(36:2); SM (C18:0); SM(d18:1/16:1); SM C16:1(d18:0/16:1)) serão apontadas como os principais alvos.

Palavras-chave: espermatozoide humano; fertilidade masculina; lipidômica, espectrometria de massas, cromatografia líquida

Abstract

CAETANO, Marília Alves. **Lipid characterization of spermatozoa from fertile men and infertile men with oligoasthenozoospermia.** 62 p. Dissertation (Master's in Science) - Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2023.

Lipids play a key role in the sperm plasma membrane, assisting in the maintenance of its structural integrity and functionality and, thus, are directly related to the process of fertilization capacity. Despite its relevance, information on the lipid profile of human sperm cells is very limited. Therefore, the main objective of this study was to characterize the lipid content of spermatozoa of fertile men and infertile men with oligoasthenozoospermia using liquid chromatography coupled with mass spectrometry (LC-MS/MS) following a profiling step by monitoring multiple reactions (MRM-profiling). A prospective observational study where lipid extracts from seminal samples of 10 fertile and 10 infertile men were analyzed was performed. Lipid extracts were obtained using the Bligh & Dyer protocol adapted for spermatozoa and stored at -80 °C until the date of submission for analysis. Samples were shipped via ground mail at room temperature after vacuum sealing. The efficiency of the extraction and shipping methods was confirmed by a preliminary analysis performed on with a pool of samples. The first stage of the MRM transitions method detected the presence of 15 lipid species in the samples (from an initial database selection of 66 metabolites). Statistical analysis of the data obtained in the second stage identified 9 lipids differentially expressed between the two groups, 6 phospholipids (PC) and 3 sphingomyelins (SM), all of them more abundant in the infertile group, suggesting a relationship between sperm lipids and male fertility. The study shows that the standardization of the techniques and methods used for lipid extraction, storage and shipping, as well as analysis via LC-MS/MS and MRM transitions allowed for a quick and sensitive lipid characterization of male gametes, using small amounts of sample. As for the results, with the exception of PC (38:5), which was previously associated with greater fertility in previous studies, all observed differences were consistent with the previous literature and, therefore, contributed to a better characterization of the lipids involved in infertility. More studies using this same approach will be needed to detect possible individual biomarkers, and the lipid species detected in this study (PC(34:0); PC (16:0); PC (34:2); PC (28:1) ; PC(36:2); SM (C18:0); SM(d18:1/16:1); SM C16:1(d18:0/16:1)) will be identified as the main targets.

Keywords: human spermatozoa; male fertility; lipidomics; mass spectrometry; liquid chromatography

Lista de figuras

| | |
|--|----|
| Figura 1 - Representação do método de extração lipídica de Bligh e Dyer. | 26 |
| Figura 2 - Gráfico de análise multivariada de componentes principais PCA.... | 35 |
| Figura 3 - . Análise Multivariada – PCA e PLS-DA para os grupos – Após remoção outlier..... | 36 |
| Figura 4 - Análise Multivariada – PCA e PLS-DA para avaliação da diferença entre os grupos..... | 37 |
| Figura 5 - Gráfico de análise multivariada de ortho-PLS-DA..... | 38 |
| Figura 6 - Gráfico de análise multivariada VIP (Variable Importance in Projection). | 39 |

Lista de tabelas

| | |
|---|----|
| Tabela 1 - Gradiente de eluição para o extrato lipídico. | 27 |
| Tabela 2 - Fragmento típico e perda neutra de cada classe lipídica..... | 28 |
| Tabela 3 - Caracterização da amostra em relação aos parâmetros seminais.... | 32 |
| Tabela 4 - Lista de metabólitos obtida através do processo de filtração manual. | 33 |
| Tabela 5 - Lista das transições MRM dos compostos detectados nas amostras. | 35 |

Lista de siglas

OMS: Organização Mundial da Saúde

EROs: Espécies reativas de oxigênio

MRM: Monitoramento de reações múltiplas

MS: Espectrometria de massas

LC: Cromatografia líquida

LC-MS/MS: Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas em Tandem

PC: Fosfatidilcolina

SM: Esfingomiéline

PS: Fosfatidilserina

PI: Fosfatidilinositois

PA: Ácido fosfatídico

ESI: Ionização por electrospray

APCI: Ionização química em pressão atmosférica

CID: Dissociação induzida por colisão

CTEP: Contagem total de espermatozoides progressivos

GAR: Gravidez de alto risco

PCA: Análise de Componentes Principais

PLS-DA: Análise de Componentes Principais Discriminantes Parciais

VIP: Variable Importance in Projection

Sumário

| | |
|--|-----------|
| 1. INTRODUÇÃO | 14 |
| 1.1. Infertilidade masculina | 14 |
| 1.2. A membrana espermática e sua funcionalidade | 15 |
| 1.3. Composição lipídica dos espermatozoides..... | 15 |
| 1.4. Espectrometria de massas por cromatografia líquida acoplada à técnica de tandem (LC-MS/MS) e transições MRM (Multiple Reaction Monitoring ou monitoramento de reações múltiplas)..... | 16 |
| 2. JUSTIFICATIVA | 19 |
| 3. OBJETIVOS | 21 |
| 4. MATERIAL E MÉTODOS | 23 |
| 4.1. Delineamento experimental e aspectos éticos | 23 |
| 4.2. Metodologias..... | 24 |
| 4.2.1. Coleta e preparo dos espermatozoides | 24 |
| 4.2.2. Extração lipídica e envio das amostras..... | 24 |
| 4.2.3. Preparo das amostras e LC-MS/MS | 26 |
| 4.2.4. Transições MRM..... | 27 |
| 4.2.5. Processamento dos dados e análise estatística..... | 29 |
| 5. RESULTADOS | 31 |
| 5.1. Padronização da técnica | 31 |
| 5.2. Caracterização da amostra..... | 31 |
| 5.3. Fase “Discovery” | 32 |
| 5.4. Fase “Screening” | 34 |
| 6. DISCUSSÃO | 41 |
| 7. CONCLUSÕES..... | 46 |
| Referências | 48 |
| Anexos..... | 64 |

Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1. Infertilidade masculina

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), a infertilidade é um quadro clínico que afeta tanto homens quanto mulheres, e essa condição é caracterizada pela incapacidade de um casal em conceber uma gravidez após um período de um ano de relações sexuais regulares e sem uso de métodos contraceptivos (ZEGERS - HOCHSCHILD et al., 2009). Aproximadamente 15% dos casais em idade reprodutiva são afetados por essa doença, e geralmente existem várias limitações diagnósticas que podem tornar difícil a identificação precisa da causa da infertilidade, podendo levar a tratamentos menos eficazes ou tardios (WHO, 2010; CARSON S. A; KALLEN A. N. 2021). O fator masculino é atribuído como único responsável em cerca de 30% a 45% dos casos, estando presente em aproximadamente 50% dos casos de infertilidade existentes (JUNGWIRTH A et al., 2012; JAROW et al., 2002).

A fertilidade masculina pode ser afetada por diversos fatores como alterações genéticas, doenças crônicas, distúrbios endócrinos, anomalias ou infecções, exposição a substâncias químicas, tabagismo, consumo excessivo de álcool, obesidade, entre outros fatores (NIESCHLAG, 2000). Apesar do aumento do interesse e avanços relacionados aos métodos diagnóstico existentes, as ferramentas disponíveis para avaliar a fertilidade masculina ainda são limitadas e muitas vezes não conseguem identificar a causa exata (HAMADA et al., 2011). Geralmente o diagnóstico inicial é feito exclusivamente pela realização de um espermograma, que apesar de ser uma técnica amplamente utilizada na prática clínica, tem entre as suas principais limitações a não avaliação da capacidade de fecundação do espermatozoide (LEWIS, 2007). Por esse motivo, diferentes metodologias tem sido utilizadas e desenvolvidas na busca por ferramentas mais precisas para a avaliação da potencial fertilidade masculina, incluindo testes de capacitação espermática, reação acrossômica, pesquisa de fragmentação do DNA espermático, análise de marcadores de estresse oxidativo, penetração espermática e hiperativação espermática (VASAN S. S, 2011). As técnicas mencionadas apresentam algumas dificuldades na aplicação como alto custo, necessidade de equipamentos sofisticados, bem como um protocolo eficiente para auxiliar no diagnóstico (VASAN S. S, 2011; ALAHMAR, 2019).

O estresse oxidativo é uma condição em que ocorre um desequilíbrio entre as espécies reativas de oxigênio (EROs) e os antioxidantes no organismo (ALAHMAR, 2019). Células espermáticas são especialmente susceptíveis ao desequilíbrio oxidativo devido ao seu volume citoplasmático reduzido (e conseqüentemente limitadas 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). O estresse oxidativo pode danificar o DNA do espermatozoide, bem como suas membranas e proteínas, comprometendo sua viabilidade e função (AITKEN, 2003; BEYGI Z. et al., 2021). Todos os estudos relacionados ao estresse oxidativo, bem como nos trabalhos de Aitken et al. (1989, 2001, 2006, 2014), sugerem que a membrana plasmática e sua composição lipídica sejam de extrema importância a qualidade espermática.

1.2. A membrana espermática e sua funcionalidade

O equilíbrio e a integridade da membrana espermática são cruciais para que a fertilização e o desenvolvimento embrionário ocorram (LENZI et al., 1996; ACTON et al., 2004). Dentre as suas diversas funções estão a sinalização celular, metabolismo energético (HERNÁNDEZ-SILVA .G et al.2020), e participação na regulação do equilíbrio oxidativo por meio de movimentações de elétrons, realizando operações redox (AITKEN, 2003).

Além disso, a membrana espermática possui proteínas especializadas, como canais iônicos e transportadores, que desempenham um papel crucial no controle do equilíbrio iônico e do potencial de membrana do espermatozoide. Isso é essencial para a sobrevivência e a funcionalidade adequada do espermatozoide no seu papel na fertilização.

Estudos sobre a composição bioquímica da membrana espermática são bastante relevantes para o entendimento da fisiopatologia do gameta masculino, e um dos componentes de destaque, tem sido os lipídios, por desempenharem um papel essencial na integridade das membranas, determinando muitas de suas propriedades físico-químicas (GLANDER et al., 2002; FUCHS et al., 2009).

1.3. Composição lipídica dos espermatozoides

Os lipídios são um grupo de moléculas orgânicas que estão presentes em todos os tipos celulares e desempenham um papel importante nos organismos vivos, como reserva energética, isolamento térmico, proteção mecânica e estrutural das células, além de serem importantes componentes das membranas celulares (KAWANO, 2011). Cada lipídio apresenta uma função específica e os mais relevantes para constituição estrutural da membrana, e conseqüentemente para esse estudo, são os fosfolipídios (YEAGLE, 2005). Nas suas configurações básicas eles possuem uma cabeça polar hidrofílica e uma cauda apolar hidrofóbica. A cabeça polar contém

um grupo fosfato que pode ser alterado por moléculas orgânicas simples dando origem a subclasses distintas, são elas: fosfatidilserina (PS), fosfatidilinositois (PI), ácido fosfatídico (PA), fosfatidilcolina (PC), fosfatidiletanolamina (PE), e fosfatidilglicerol (PG). As esfingomiélinas (SM), apesar de possuírem uma base de esfingosina e apenas 1 ácido graxo, também podem ser consideradas como parte do grupo dos fosfolipídios devido à grande semelhança estrutural (YEAGLE, 2005).

O predomínio de PC nas células espermáticas foi observado nos primeiros estudos realizados com amostras de salmões por Miescher¹ (1878, 1897 apud LOVERN e OLLEY, 1956). Técnicas de cromatografia em camada delgada foram utilizadas por Poulos e White (1973) e alcançaram as seguintes proporções entre as subclasses lipídicas mais abundantes no espermatozoide humano: PC (28,8%), PE (21,6%), SM (21,4%), PE_p (9,4%), PS (4,7%), PC_p (2,7%), PI (1,9%), e PG (1,6%). Posteriormente, foram realizadas análises subsequentes do perfil lipídico espermático humano que confirmaram a prevalência de PC e PE, além da presença expressiva de ácidos graxos poli-insaturados (LENZI et al., 1996; SCHILLER, 2000; LEBIG et al., 2004). A partir desse momento, a busca por informações relacionadas a análise de lipídios e outros 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 por cromatografia líquida acoplada à técnica de tandem (LC-MS/MS) e transições MRM (Multiple Reaction Monitoring ou monitoramento de reações múltiplas)

A espectrometria de massas por cromatografia líquida acoplada à técnica de tandem, ou LC-MS/MS (Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry) em inglês, é uma técnica analítica avançada que combina as capacidades de separação da cromatografia líquida, com a detecção sensível e seletiva da espectrometria de massas em tandem (LI J, 2020) . O processo começa com a preparação da amostra, que pode envolver extração, purificação e concentração, conforme necessário para a análise. A amostra é então introduzida em um sistema de cromatografia líquida, onde os componentes da amostra são separados com base em suas propriedades físico-químicas à medida que fluem através da coluna (LI K, et al., 2022).

Após a separação, os analitos entram no espectrômetro de massas, onde são ionizados usando a técnica de ionização por electrospray (ESI) ou ionização química em pressão atmosférica (APCI). Essa ionização converte os analitos em íons no estado gasoso. Os íons gerados são então submetidos à espectrometria de massa em tandem, que consiste em duas

etapas: seleção de íons precursores e fragmentação (LI K et al., 2022).

Na etapa de seleção de íons precursores, um íon específico de interesse é selecionado a partir da mistura de íons gerada na ionização. Isso pode ser feito utilizando-se filtros de massa quadrupolares ou armadilhas de íons, entre outros métodos. Em seguida, os íons precursores selecionados passam por uma etapa de fragmentação, que pode ser realizada por dissociação induzida por colisão (CID) ou outra técnica de fragmentação. Essa fragmentação faz com que os íons precursores se quebrem em fragmentos menores, produzindo íons fragmentos característicos (BECKER S et al., 2012). Por fim, os íons fragmentos resultantes são detectados por um analisador de massa, que mede a razão massa/carga (m/z) e a abundância dos íons, gerando um espectro de massa. Os espectros de massa obtidos são processados e analisados por meio de software especializado, que compara os espectros adquiridos com espectros de referência ou bancos de dados para identificar e quantificar os analitos presentes na amostra. Para complementar a técnica, as transições MRM (Multiple Reaction Monitoring) são utilizadas em espectrometria de massas para a quantificação de compostos específicos em uma amostra. Nesse método, duas etapas de reação são monitoradas para detectar e quantificar um analito de interesse com alta sensibilidade e seletividade (CHEM M. J.A, et al., 2010). A primeira etapa consiste na seleção e fragmentação do analito-alvo, resultando em fragmentos característicos. Na segunda etapa, esses fragmentos são monitorados, permitindo a quantificação precisa do analito. As transições MRM são particularmente úteis na análise de compostos de baixa abundância em matrizes complexas, como amostras biológicas, devido à sua alta sensibilidade e capacidade de separar o sinal do analito do ruído de fundo. Juntos, esses dois métodos (LC-MS/MS e transições MRM) oferece alta sensibilidade, seletividade e especificidade, tornando-a adequada para a análise de amostras complexas com baixas concentrações de analitos (LÓPEZ-BASCON M. A 2020). Essa técnica é amplamente utilizada em laboratórios de pesquisa, ambientes clínicos e indústrias para uma ampla gama de aplicações, incluindo descoberta de medicamentos, triagem toxicológica, proteômica e monitoramento ambiental, e possíveis biomarcadores que auxiliarão em diagnósticos futuros.

Justificativa

2. JUSTIFICATIVA

A investigação da composição lipídica dos espermatozoides é de grande importância para o entendimento melhor do gameta masculino, considerando-se a grande relevância dos lipídios para a função espermática. Nesse sentido, a caracterização da composição lipídica de espermatozoides de homens férteis, por meio da técnica LC-MS/MS e da abordagem de transições MRM, pode trazer informações cruciais para a melhor compreensão de marcadores de boa qualidade gamética. Essas informações podem servir como base para estudos comparativos futuros e, potencialmente, identificar biomarcadores que auxiliem na detecção da infertilidade masculina, ao compararmos a composição lipídica dos espermatozoides de homens inférteis e férteis. Ademais, a padronização das técnicas envolvidas para analisar a composição lipídica em quantidades reduzidas de espermatozoides nos homens inférteis tem o potencial de propiciar o desenvolvimento de métodos diagnósticos simples e de baixo custo que possam ser facilmente aplicados em clínicas ao redor do mundo. Em resumo, esse estudo tem o potencial de contribuir significativamente para o campo da medicina reprodutiva, possibilitando avanços no diagnóstico e tratamento da infertilidade masculina.

Objetivos

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

- Realizar a análise e caracterização lipídica de espermatozoides de homens férteis e homens inférteis com oligoastenozoospermia por meio da técnica de LC-MS/MS através de transições MRM.

3.2 Objetivos específicos

- Realizar a padronização das técnicas de extração lipídica seminal e LC-MS/MS e transições MRM para concentrações espermáticas muito baixas (amostras menores que 1 milhão de espermatozoides progressivos);
- Realizar a análise e caracterização lipídica de espermatozoides de homens férteis através de transições MRM e homens inférteis com oligoastenozoospermia (amostras menores que 1 milhão de espermatozoides progressivos) por meio da técnica de LC-MS/MS através de transições MRM.

Material e métodos

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Delineamento experimental e aspectos éticos

Neste estudo observacional analítico, foi realizado o recrutamento dos participantes, coleta e preparo das amostras de sêmen humano, bem como a extração lipídica no Laboratório de Ginecologia e Obstetrícia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - HCFMRP-USP. A validação do protocolo de extração, condições de armazenamento, envio das amostras e análise dos extratos lipídicos por LC-MS/MS foi realizada em parceria com a empresa Apex Science, sob a responsabilidade do pesquisador João Raul Belinato, situada em Campinas (SP). Aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HCFMRP-USP Paulo e pela comissão de pesquisa do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia, este estudo recebeu o número de parecer 2.748.533 (anexo 1).

4.1.1. Pacientes

Os pacientes que integraram a pesquisa foram convidados a participar mediante a sua concordância e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (anexo 2). O estudo recrutou homens com idade entre 20 e 45 anos (SINGH et al., 2003), que se abstiveram de atividade sexual por 2 a 5 dias antes da coleta do sêmen e não tinham histórico de câncer, uso de medicamentos que afetam a espermatogênese, febre ou infecção ativa e azoospermia (GARDNER et al., 2012).

O grupo de homens inférteis foi composto por pacientes que estavam em busca do serviço de reprodução assistida no Setor de Reprodução Humana do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto (HCRP). Somente os participantes com contagem total de espermatozoides progressivos (CTEP) menor ou igual a 1 milhão foram incluídos neste grupo (HAMILTON et al., 2015; BORGES et al., 2016).

O grupo de homens férteis foi composto por voluntários recrutados a partir de uma lista de pacientes do ambulatório de pacientes com gravidez de alto risco (GAR) do HCFMRP. Os participantes foram inicialmente contatados por telefone e os interessados compareceram ao HCFMRP para realizar a coleta seminal e assinar o TCLE. Um dos critérios de inclusão era ter pelo menos um filho com idade de até 2 anos de idade.

4.2. Metodologias

4.2.1. Coleta e preparo dos espermatozoides

Foi coletado material seminal e, em seguida, uma quantidade de 0,5 ml desse material foi utilizada para realizar o espermograma por microscopia óptica. O objetivo foi determinar a concentração, motilidade, morfologia e vitalidade do esperma, seguindo as orientações estabelecidas na 6ª Edição do Manual da Organização Mundial de Saúde (WHO, 2021) e a 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; RODRIQUEZRIGAU; STEINBERGER, 1977; AYALA et al., 1996). Esse critério foi utilizado para selecionar no grupo de pacientes inférteis, os que foram incluídos neste estudo (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).

Depois da realização do exame e cálculos de concentração, o remanescente da amostra foi submetido à técnica de "sperm-wash", que envolve a adição do mesmo volume de meio Gamete Buffer (Sidney IVF, Sidney, Austrália), e centrifugação a 1000 rpm por 10 minutos. Após a primeira lavagem, o sobrenadante foi descartado e o pellet resultante ressuspendido em 1mL de Gamete Buffer, seguido de nova contagem da concentração de espermatozoides. Em seguida, foi feito um cálculo utilizando a regra de três para obter o volume necessário e padronizar a concentração em $0,2 \times 10^6$ espermatozoides por alíquota. A padronização da concentração da amostra é essencial para garantir a confiabilidade dos resultados durante a análise buscando minimizar discrepâncias significativas entre elas, o que é crucial para a interpretação precisa dos dados. Cada amostra foi dividida em três alíquotas de 333,33 μ l em microtubos estéreis da marca Corning, Axygen® e então armazenadas no freezer a -80°C . Após a coleta de todas as amostras, foi realizado um novo ciclo de lavagem na centrífuga, os sobrenadantes foram novamente descartados e os lipídios foram extraídos do pellet resultante, que contém os espermatozoides. A análise dos lipídios foi realizada por LC-MS/MS, seguindo os procedimentos descritos a seguir.

4.2.2. Extração lipídica e envio das amostras

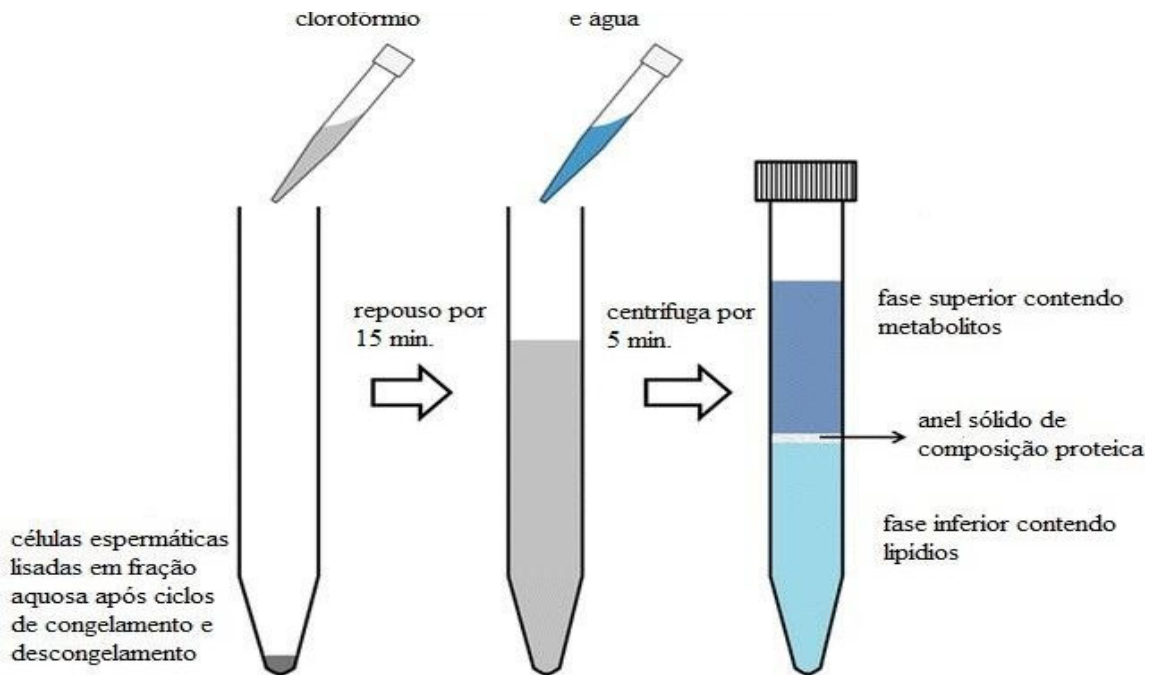
O protocolo de Bligh & Dyer (1959) foi utilizado para a realização das extrações lipídicas (Figura 1) com algumas modificações feitas a fim de adaptá-lo para células

espermáticas envolvendo a alternância entre processos em baixas temperaturas e temperatura ambiente. Isso auxilia na seletividade da extração, aumenta as taxas de difusão, assegura a seletividade e mantém a estabilidade dos componentes. Após o preparo das amostras descrito acima, aos três pellets de cerca de 333,3 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%) gelados à fração aquosa nos volumes de 450 e 250 μl , respectivamente. Para auxiliar na lise celular, as amostras foram submetidas ao banho de ultrassom com gelo durante 15 minutos. As amostras foram homogeneizadas e, após 15 minutos de descanso em temperatura ambiente, 200 μl de clorofórmio e água gelados 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 mantidas 16h (overnight) sob agitação constante, e então 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 1).

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 a Apex Science (Campinas-SP), foi realizado via correio terrestre em temperatura ambiente e após sua chegada, foram rearmazenadas no freezer a -80°C . Após 8 dias da extração, elas foram ressuspensas e analisadas.

Figura 1 - Representação do método de extração lipídica de Bligh e Dyer.



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

4.2.3. Preparo das amostras e LC-MS/MS

As amostras contendo os extratos lipídicos, foram ressuspensas utilizando 50 μL de solução ACN + MeOH+300 mM NH_4Ac 3:6.65:0.35 (v/v) agitando-se por 2 minutos. Após a agitação, as amostras foram centrifugadas por 10 min à 4 °C e 13000 rpm. Em seguida, o sobrenadante foi transferido para um vial de 2 mL e 5 μl da solução foi injetado no instrumento de UHPLC-MS/MS (Xevo TQ-S micro, Waters). A análise cromatográfica foi realizada empregando uma coluna Acquity UPLC CSHT Fluoro-Phenyl (100mm x 2,1mm (1,7 μm)). O fluxo de fase móvel utilizado foi de 0,5 mL/min e a coluna foi mantida à 50 °C durante toda a eluição cromatográfica. O gradiente de fase móvel utilizada é apresentado na Tabela 1, onde a fase móvel A utilizada trata-se de água acidificada com 0,1 de ácido fórmico e a fase B trata-se de acetonitrila acidificada com 0,1% de ácido fórmico. Já o espectrômetro de massas foi operado no modo de aquisição MRM utilizando APCI+ e um fluxo de gás de dessolvatação de 650 L/h, fluxo do gás do cone de 7 L/h, voltagem do cone em 25 V, temperatura da fonte de 550 °C e corrente de descarga corona de 1.0 A

Tabela 1 - Gradiente de eluição para o extrato lipídico.

| Tempo (min) | Fase móvel A (%) | Fase móvel B (%) |
|--------------------|-------------------------|-------------------------|
| Inicial | 65 | 35 |
| 3 | 0 | 100 |
| 4 | 0 | 100 |
| 4,01 | 65 | 35 |
| 5 | 65 | 35 |

Fonte: produção do autor

Para a espectrometria de massas, foi utilizado o equipamento híbrido com analisador de massas do tipo triplo quadropolo Xevo TQ-S micro. O MS foi operado em modo de ionização positiva APCI+ (Atmospheric Pressure Chemical Ionization), usando monitoramento de reações múltiplas (MRM). A voltagem do cone foi de 25V e o fluxo de gás do cone de 7,0 L/h a 550 °C, de acordo com os parâmetros instrumentais estabelecidos com a otimização da metodologia. A faixa de massas utilizada para a aquisição foi de 80 - 1200 Da.

4.2.4. Transições MRM

Uma lista de metabólitos foi criada a partir de estudos anteriores em conjunto com a base de dados da plataforma online LipidMAPS, contendo a m/z dos todos os lipídios de cada classe de interesse que foi, então, filtrada manualmente com base na literatura.

Em seguida as informações foram analisadas de acordo com as características dos lipídios (Tabela 2) em relação a fragmentação, com o íon precursor e o íon de produto selecionado, a força de sinal, m/z típica dos fragmentos e a seletividade do composto alvo visando compor a lista final de transições 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] ⁺ | <i>m/z</i> 184 | 1,2 |
| PE | [M+H] ⁺ | Perda neutra de 141 | 1,2 |
| Sulfatídeos e seminolípidos | [M+H] ⁺ | <i>m/z</i> 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).

Posteriormente, o processo foi dividido em duas fases: “Discovery” e “Screening” para criação de transições MRM validadas. Na primeira, pools representativos de cada grupo (férteis e inférteis) foram analisados com base nas listas preparadas previamente e comparados com amostras “em branco”. Os lipídios das amostras biológicas que apresentaram transições finais de 184,1 foram selecionados e utilizados para compor novos métodos contendo apenas os lipídios de interesse presentes nas amostras. Na fase seguinte, uma nova lista foi criada e utilizada 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 dados brutos de análise foram convertidos para o formato de arquivo Excel e as intensidades obtidas para cada composto avaliado foram alocadas na matriz de dados de amostras. Em seguida, a matriz de dados obtida contendo a intensidade relativa dos íons e os dados foram escalados utilizando o escalonamento de Pareto[1] antes das análises estatísticas multivariadas. Os dados escalados foram inicialmente submetidos à análise exploratória de dados utilizando os métodos não supervisionados de Análise de Componentes Principais (PCA – do inglês, Principal Component Analysis) [2] de forma a verificar a variabilidade dos dados a partir da comparação com os brancos e controles de qualidade. Por fim, foi empregada a análise discriminante por quadrados mínimos parciais (PLS-DA – do inglês, Partial Least Squares Discriminant Analysis)[3], um método supervisionado de classificação para identificar os metabólitos alterados entre os grupos e estabelecer os potenciais biomarcadores. Foram considerados potenciais biomarcadores as variáveis localizadas longe do agrupamento central da maioria das variáveis no loading plot bem como os resultados fornecidos pelo índice VIP ($VIP > 1,0$). A normalização dos dados, escalamento e análises estatísticas uni e multivariadas foram realizadas utilizando a plataforma online MetaboAnalyst 5.0 (www.metaboanalyst.ca)[4]).

Os parâmetros seminais foram sumarizados considerando as medidas de posição central (média e mediana) e as medidas de dispersão (desvio padrão, intervalos interquartil e valores mínimos e máximos). Para verificar se existe uma diferença estatística em relação aos grupos fértil e controle foi aplicado o teste não paramétrico de Wilcoxon para amostras independentes. Este teste é indicado quando a distribuição dos dados não atende aos pressupostos de normalidade. Esta análise foi implementada no programa SAS versão 9.

Resultados

5. RESULTADOS

5.1. Padronização da técnica

Após a realização do espermograma e processo de lavagem, as amostras de pacientes com perfis seminais distintos foram processadas seguindo o protocolo de Bligh & Dyer (1959) adaptado para células espermáticas. Os extratos lipídicos de cada paciente foram divididos em triplicatas e acondicionados em 3 frascos estéreis. As amostras foram inertizadas com gás nitrogênio e armazenadas à -80 °C por 8 dias até serem enviadas para análise por LC-MS/MS na Apex Science em Campinas (SP). O resíduo lipídico foi então ressuspensionado na solução ACN + MeOH+300 mM NH₄Ac 3:6.65:0.35 (v/v) e análises adicionais com um *pool* de amostras controles (QC) aleatórias entre os dois grupos foram realizadas testando a sensibilidade e precisão, bem como o monitoramento da estabilidade do instrumento e validação dos resultados. Os espectros apresentaram picos de intensidade em valores de massa relativos a fosfolipídios e houve agrupamento dos QC, confirmando a precisão e exatidão do método analítico.

5.2. Caracterização da amostra

Neste estudo, foram comparadas as variáveis seminais de dois grupos distintos: um grupo de homens férteis e outro de homens inférteis. Elas são provenientes de 20 homens com idades entre 20 e 45 anos, sendo 10 do grupo controle (homens férteis) e 10 do grupo de estudo (homens inférteis). No grupo de homens férteis (F), a idade média foi de 34 anos e todos os participantes relataram ter um filho de até 2 anos no momento. Já no grupo de homens inférteis (IF), a idade média foi de 36 anos com TEP < 1 milhão de espermatozoides progressivos. Não houve diferença estatisticamente significativa entre a idade média dos homens férteis e inférteis (p-valor = 0,5167).

Comparando-se os diferentes parâmetros do espermograma entre homens férteis e inférteis, não observamos diferença estatisticamente significativa apenas na porcentagem de espermatozoides com motilidade não progressiva e volume seminal (Tabela 3). Observamos redução estatisticamente significativa no tempo de liquefação, concentração de espermatozoides, porcentagem de espermatozoides progressivos e imóveis, vitalidade e morfologia nas amostras seminais de homens inférteis quando comparados férteis (Tabela 3).

Tabela 3 - Caracterização da amostra em relação aos parâmetros seminais.

| Variável | grupo | N. Obs. | Media | Des. Pad. | Mediana | Q1 | Q3 | Min | Max | P-valor |
|--------------------|----------|---------|--------|-----------|---------|------|-----|-------|------|---------|
| Idade | controle | 10 | 34.7 | 3.95 | 36 | 32 | 38 | 28 | 40 | 0.5167 |
| | infertil | 10 | 36.1 | 5.17 | 37 | 32 | 40 | 28 | 45 | |
| Volume | controle | 10 | 2.90 | 1.36 | 3.35 | 1.50 | 4 | 0.80 | 4.5 | 0.8797 |
| | infertil | 10 | 2.88 | 1.14 | 2.85 | 2 | 3.8 | 1 | 4.7 | |
| Liquefação | controle | 10 | 53 | 8.56 | 57.5 | 45 | 60 | 40 | 60 | 0.0003 |
| Concentração_total | infertil | 10 | 24 | 10.49 | 20 | 15 | 30 | 10 | 40 | 0.0002 |
| | controle | 10 | 203.19 | 178.53 | 148.8 | 42 | 359 | 41.12 | 554 | |
| Progressivos | infertil | 10 | 5.58 | 4.67 | 4.43 | 3.6 | 5.7 | 2.2 | 18.4 | 0.0002 |
| | controle | 10 | 47.9 | 15.61 | 48 | 39 | 62 | 21 | 68 | |
| Não_Progressivos | infertil | 10 | 7.6 | 7.95 | 6 | 0 | 12 | 0 | 24 | 0.1715 |
| | controle | 10 | 27.8 | 12.52 | 31 | 15 | 36 | 13 | 49 | |
| Imóveis | infertil | 10 | 37.1 | 18.98 | 42 | 24 | 54 | 3 | 57 | 0.0013 |
| | controle | 10 | 26.3 | 7.96 | 24.5 | 21 | 30 | 17 | 43 | |
| Vitalidade | infertil | 10 | 55.3 | 24.08 | 42.5 | 36 | 76 | 34 | 97 | 0.0005 |
| | controle | 10 | 86.6 | 5.49 | 88 | 85 | 89 | 76 | 96 | |
| Morfologia | infertil | 10 | 62.6 | 2.9 | 69 | 57 | 72 | 11 | 85 | 0.0004 |
| | controle | 10 | 5 | 1.89 | 5 | 4 | 7 | 2 | 8 | |
| | infertil | 10 | 1.5 | 1.5 | 1.5 | 1 | 2 | 0 | 3 | |

Nota: Análises estatísticas com o teste não paramétrico de Wilcoxon para amostras independentes

5.3. Fase “Discovery”

A pesquisa inicial na base de dados Metabolights e LipidMaps gerou uma relação de metabólitos pertencentes à diferentes classes de interesse, incluindo fosfatidilcolina (PC), esfingomiéline (SM), fosfatidilinositol (PI), fosfatidilglicerol (PG) e sulfatídeos.

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). Diante da remoção de interferências e da concentração dos analitos de interesse, foi estabelecida uma lista de 66 metabólitos (Tabela 4) potencialmente presentes nos espermatozoides humanos. Embora a análise tenha abrangido diversas classes de metabólitos, como ácidos nucleicos, aminoácidos e intermediários metabólicos, que foram utilizados como padrões de referência disponíveis, o foco subsequente se voltou para as classes de lipídios, pois eram o principal alvo do estudo, sendo a maioria pertencente às classes PC e SM.

A literatura sugere que os fosfolipídios PC (Fosfatidilcolina) e SM (Esfingomiéline) estão mais abundantemente presentes na membrana do espermatozoide e desempenham papéis cruciais em sua estrutura e funcionalidade. Embora outros fosfolipídios como PS

(Fosfatidilserina) e PE (Fosfatidiletanolamina) também sejam encontrados na membrana do espermatozoide (SCHUFFNER et al., 2008), restrições orçamentárias e de tempo hábil limitaram a viabilidade de conduzir análises adicionais.

Dentre os metabólitos, os lipídios selecionados foram reorganizados e utilizados para interrogar individualmente as amostras na etapa seguinte.

Tabela 4 - Lista de metabólitos obtida através do processo de filtragem manual.

| Quantidade | Nome do composto | Q1 (m/z) | Q3 (m/z) | Íon |
|------------|--|----------|------------|-----|
| 1 | β -D-Glucosil-N-docosanoilsfingosina | 782,6 | 333,3 | (-) |
| 2 | PC (38:6) | 806,6 | 184,1 | (+) |
| 3 | PC (40:4) | 838,6 | 184,1 | (+) |
| 4 | PC (42:5) | 864,6 | 184,1 | (+) |
| 5 | PC (40:6) | 834,6 | 184,1 | (+) |
| 6 | PC (38:5) | 808,6 | 184,1 | (+) |
| 7 | PC (34:2) | 758,6 | 184,1 | (+) |
| 8 | PC (34:0) | 762,6 | 184,1 | (+) |
| 9 | PC (36:3) | 784,6 | 184,1 | (+) |
| 10 | PC (38:4) | 810,6 | 184,1 | (+) |
| 11 | PC (28:1) | 676,5 | 184,1 | (+) |
| 12 | PC (40:5) | 836,6 | 184,1 | (+) |
| 13 | PC (36:2) | 786,6 | 184,1 | (+) |
| 14 | PC (38:0) | 818,6 | 184,1 | (+) |
| 15 | PC (36:4) | 781,6 | 184,1 | (+) |
| 16 | PC (38:3) | 812,6 | 184,1 | (+) |
| 17 | PC 16:0/18:1 | 759,6 | 184,1 | (+) |
| 18 | Metilbutirilcarnitina (C5) | 246,1 | 85,1 | (+) |
| 19 | Sulfatida SGG C24:1 | 888,6 | 97 | (-) |
| 20 | Sulfato de colesterol | 465,3 | 97 | (-) |
| 21 | SM C16:1 esfingomielina (d18:1/16:1) | 717,5 | 184,1 | (+) |
| 22 | SM C18:0 esfingomielina (d18:1/18:0) | 731,6 | 184,1 | (+) |
| 23 | SM C16:1 esfingomielina (d18:0/16:1) | 716,6 | 184,1 | (+) |
| 24 | SM Esfingomielina C14:1 (d18: 0/14: 1) | 689,5 | 184,1 | (+) |
| 25 | 19:0 Lisofosfatidilcolina | 537,4 | 184,1 | (+) |
| 26 | Glicerofosfocolina (GPC) | 257,1 | 184,1 | (+) |
| 27 | SGG (O-32:0) | 795,7 | 97.0/539.3 | (-) |
| 28 | SGG (O-30:0) | 767,6 | 97 | (-) |
| 29 | SGG (O-33:0)/PI (32:0) | 809,7 | 97 | (-) |
| 30 | SGG (O-34:1)/SGG (P-34:0) | 821,7 | 97 | (-) |
| 31 | SGG (O-34:0)/PI (O-34:0) | 823,7 | 97 | (-) |
| 32 | Hypotaurina | 110,2 | 108/64 | (+) |
| 33 | Selenocistina | 335 | 247 | (-) |
| 34 | dUDP | 412 | 136 | (+) |
| 35 | Espermina | 203,2 | 84,1 | (+) |

| | | | | |
|----|---------------------------------|-------|-----------|-----|
| 36 | Serotonina | 177,1 | 160 | (+) |
| 37 | Espermidina | 146,1 | 72 | (+) |
| 38 | Tripropanoato de glicerol | 260,1 | 184,1 | (+) |
| 39 | Carnitina (C0) | 161,1 | 85,1 | (+) |
| 40 | Acetilcarnitina (C2) | 204,1 | 85,1 | (+) |
| 41 | Hexanoilcarnitina C6 (C4: 1-DC) | 260,2 | 85,1 | (+) |
| 42 | Triptofano | 205,1 | 146.1/188 | (+) |
| 43 | Ácido glutâmico | 148 | 84/129 | (+) |
| 44 | Ácido aspártico | 134 | 88 | (+) |
| 45 | Ácido láctico | 90 | 45 | (+) |
| 46 | Prolina | 116,1 | 70 | (+) |
| 47 | Alanina | 90 | 55 | (+) |
| 48 | Metionina | 150 | 61 | (+) |
| 49 | Ácido L-málico | 135 | 117 | (+) |
| 50 | Ácido láctico | 90 | 45 | (+) |
| 51 | Ácido 5-aminovalérico | 118,1 | 101/55 | (+) |
| 52 | Ácido 8-aminocaprílico | 160,1 | 142,1 | (+) |
| 53 | Desoxiuridina trifosfato | 469,1 | 81/159 | (+) |
| 54 | Acrilil-CoA | 822,1 | 136 | (+) |
| 55 | Formil-CoA | 796,1 | 136 | (+) |
| 56 | Malil-CoA | 854,1 | 136 | (+) |
| 57 | Lactil-CoA | 840,1 | 136 | (+) |
| 58 | Acetil-CoA | 810,1 | 303/136 | (+) |
| 59 | Metilmalonilcarnitina | 262,1 | 85,1 | (+) |
| 60 | Propionilcarnitina (C3) | 218,1 | 85,1 | (+) |
| 61 | Metacrilil-CoA | 836,1 | 329,1 | (+) |
| 62 | Tiglicarnitina (C5:1) | 386,3 | 85,1 | (+) |
| 63 | L-Cisteína | 122 | 76/59 | (+) |
| 64 | 3-fosfoglicerato | 187 | 97 | (+) |
| 65 | 2-Amino-1-feniletanol | 138 | 103/120 | (+) |
| 66 | Ditiol-eritritol | 155 | 59 | (+) |

Fonte: produção do autor

5.4. Fase “Screening”

Foram realizadas análises em extratos lipídicos obtidos de espermatozoides de 10 pacientes comprovadamente férteis e 10 pacientes inférteis, em triplicata, totalizando 60 amostras. Após a separação por LC, a amostra foi direcionada para espectrometria de massas, na qual foi executada a ionização por APCI+, normalizando a contagem total de íons de cada amostra. Dos 66 metabólitos previamente selecionados e avaliados via LC-MS/MS, apenas 15 lipídios (Tabela 5) das classes PC e SM foram detectados.

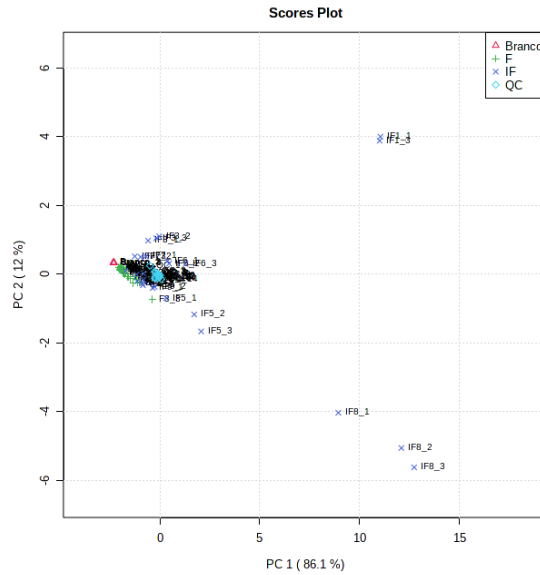
Tabela 5 - Lista das transições MRM dos compostos detectados nas amostras.

| Composto | Transição | Tempo de Retenção | Energia de Colisão |
|---|---------------|-------------------|--------------------|
| PC (28:1) | 676,5 > 184,1 | 2,2 – 2,7 | 20 |
| PC (34:0) | 762,6 > 184,1 | 2,8 – 3,4 | 20 |
| PC (34:2) | 758,6 > 184,1 | 2,6 – 3,2 | 20 |
| PC (36:2) | 786,6 > 184,1 | 2,6 – 3,8 | 20 |
| PC (36:3) | 784,6 > 184,1 | 2,7 – 3,2 | 20 |
| PC (36:4) | 781,6 > 184,1 | 2,4 – 3,0 | 20 |
| PC (38:0) | 818,6 > 184,1 | 2,7 – 3,2 | 20 |
| PC (38:3) | 812,6 > 184,1 | 2,7 – 3,7 | 20 |
| PC (38:4) | 810,6 > 184,1 | 2,7 – 3,3 | 20 |
| PC (38:5) | 808,6 > 184,1 | 2,5 – 3,2 | 20 |
| PC (38:6) | 806,6 > 184,1 | 2,5 – 3,1 | 20 |
| PC 16:0/18:1 | 759,6 > 184,1 | 2,6 – 3,2 | 20 |
| SM C16:1 esfingomielina (d18:0/16:1) | 716,6 > 184,1 | 2,6 – 3,3 | 20 |
| SM C16:1 esfingomielina (d18:1/16:1) | 717,5 > 184,1 | 2,4 – 3,1 | 20 |
| SM C18:0 esfingomielina (d18:1/18:0) | 731,6 > 184,1 | 2,4 – 3,3 | 20 |

Fonte: produção do autor

Para investigar a correlação de dispersão dos dados frente aos QC e agrupamento das amostras, foi realizada uma análise multivariada, e conforme pode ser observado no gráfico de componente principal (PCA) (Figura 2), as amostras IF1 e IF8 apresentam uma grande diferença em relação ao restante do grupo, sendo, portanto, *outliers*. Nesse caso, optou-se por eliminar as duas amostras para dar sequência à avaliação estatística.

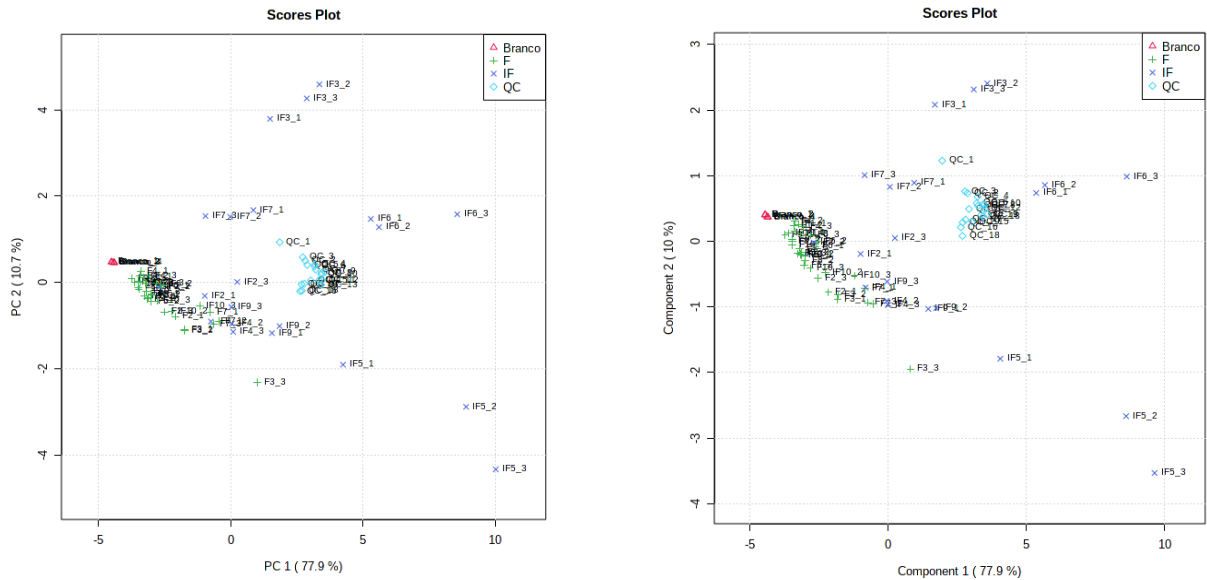
Figura 2- Gráfico de análise multivariada de componentes principais PCA.



Com a remoção dos grupos IF1 e IF8 pertencentes ao grupo de homens inférteis (Figura 3) foi possível perceber que houve um agrupamento significativo entre as “amostras branco” e o controle de qualidade (QC), ou seja, não houve variações ao longo da corrida cromatográfica.

Contudo, é possível perceber que o grupo IF apresentou ampla dispersão, sendo, portanto, um indicativo da alta variação dentro do mesmo grupo. Para o grupo F, foi possível verificar um maior agrupamento dos dados, podendo-se inferir que existe maior semelhança para este grupo.

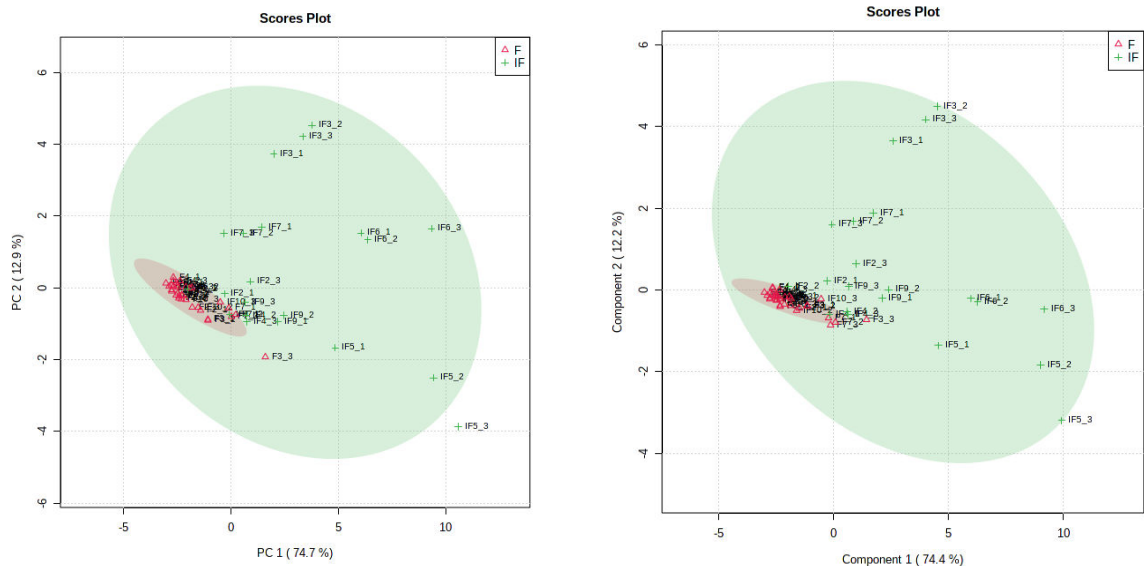
Figura 3 - . Análise Multivariada – PCA e PLS-DA para todas os grupos – Após remoção outlier.



Assim, diante dos resultados obtidos, realizou-se uma apuração mais precisa, buscando encontrar os principais metabólitos responsáveis pela diferenciação entre os grupos F e IF.

Em seguida, mesmo havendo uma variação significativa na composição de cada grupo resultando em uma dispersão ampla, foi observada uma zona de intersecção entre os grupos através de uma avaliação comparativa nos gráficos de PCA E PLS-DA (Figura 4).

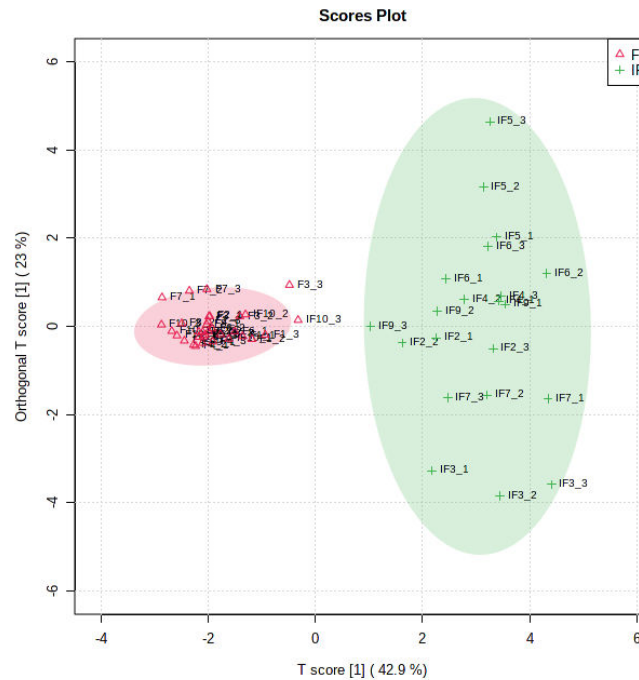
Figura 4 - Análise Multivariada – PCA e PLS-DA para avaliação da diferença entre os grupos.



Os gráficos mostram uma zona de intersecção entre os dois grupos podendo ser influenciada por várias fontes de variabilidade presentes nos espermatozoides de homens férteis (vermelho) e inférteis (verde).

Buscando auxiliar o modelo estatístico e eliminar o efeito secundário e componentes latentes que não estão relacionados a resposta, utilizou-se a estratégia de ortho-PLS-DA. Apenas os principais metabólitos responsáveis pela diferenciação foram utilizados para a classificação das amostras. Assim, houve uma melhora significativa na separação entre os grupos, e, foi possível identificar os principais metabólitos responsáveis pela diferenciação (Figura 5).

Figura 5 - Gráfico de análise multivariada de ortho-PLS-DA.

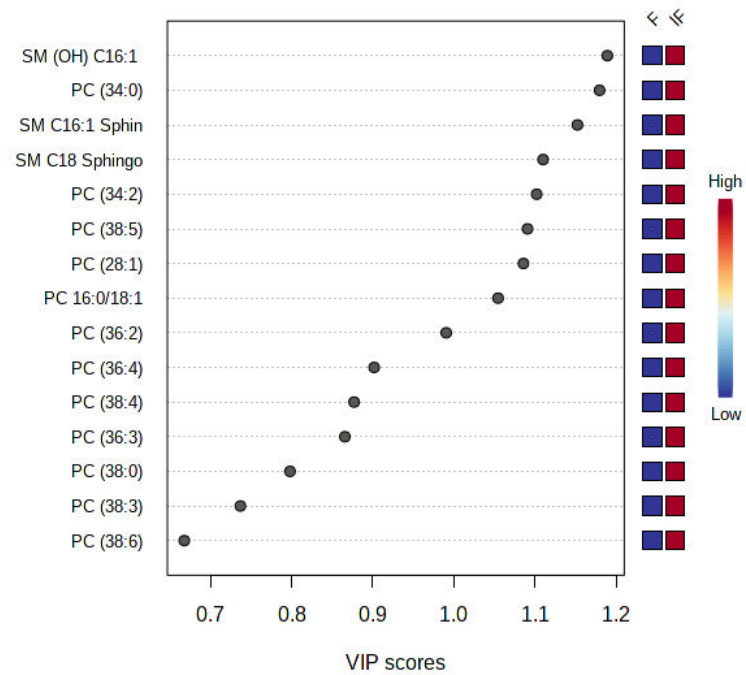


Nota: Representação visual na forma análise multivariada de Ortho-PLS-DA realizada para comparar os grupos de pacientes comprovadamente férteis (vermelho) e pacientes inférteis (verde), baseada em dados de contribuição para a variação (%) dos componentes 1 (eixo X) e 2 (eixo y) selecionados para maximizar a discriminação entre os grupos. Fonte: Produção do autor.

Por fim, a ferramenta estatística VIP (Variable Importance in Projection), foi utilizada para para identificar quais lipídios são mais relevantes e distingui-los entre os dois grupos de estudo.

Foi possível verificar que 9 lipídios (Figura 6) podem ser considerados significativos na separação entre os grupos e que há uma maior concentração dos metabólitos no grupo infértil quando comparado ao grupo fértil, demonstrando que houve uma regulação negativa nesse caso. As PC representaram 6 dos compostos mais expressos no grupo infértil, sendo dois deles saturados (PC 34:0; PC 16:0) e quatro insaturados (PC 34:2; PC 38,5; PC 28:1; PC36:2). No caso das SM, um composto é saturado (SM C18:0) e dois monoinsaturados (SM(d18:1/16:1); SM C16:1(d18:0/16:1)).

Figura 6 - Gráfico de análise multivariada VIP (Variable Importance in Projection).



Representação gráfica para identificar as variáveis (ou características) mais importantes que contribuem para a separação ou discriminação dos grupos estudados. Os 9 lipídios detectados acima do VIP score 1,0 (eixo x) são considerados mais relevantes para a diferenciação dos grupos.

Discussão

6. DISCUSSÃO

O diagnóstico do fator masculino de infertilidade tem se baseado principalmente nos parâmetros analisados no espermograma, como concentração, motilidade, morfologia, e vitalidade (FAINBERG e KARSHANIAN, 2019). Embora o exame seja uma ferramenta importante na propedêutica da infertilidade masculina, ele não permite uma abordagem centrada na causa do problema e, conseqüentemente, não possibilita o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas para a infertilidade masculina.

Em decorrência disso, pesquisadores tem focado em estudos que busquem desvendar as causas da infertilidade, trazendo propostas de métodos diagnósticos alternativos (MORIN e SCOTT, 2018; SIMONI e SANTI, 2019), como por exemplo testes de avaliação de fragmentação do DNA espermático, do equilíbrio oxidativo e abordagem metabolômica, na qual se enquadra o estudo da caracterização lipídica espermática.

Um número crescente de publicações relacionando lipídios presentes na membrana espermática com a fertilidade masculina pode ser observado na literatura atual. Porém, até o momento, poucos desses estudos objetivaram caracterizar os lipídios de homens férteis e inférteis com oligoastenozoospermia de maneira independente dos parâmetros seminais clássicos.

Neste estudo, foi utilizada a técnica de LC-MS/MS, que envolve a separação dos lipídios por cromatografia líquida e sua posterior detecção e quantificação por espectrometria de massa, com foco em transições de reação monitorada (MRM), que são específicas para lipídios de interesse e utilizadas para investigação de espermatozoides de homens férteis e inférteis com oligoastenozoospermia. Um exemplo recente da aplicação dessa técnica, foi um estudo que fez uma comparação do perfil lipídico de 38 homens que atingiram ou não uma gravidez via injeção intracitoplasmática (ICSI) e identificou 151 classes lipídicas distintas nas amostras (RIVERA-EGEA et al., 2019). Provavelmente, essa diferença detectada no número de espécies originou-se na disparidade de perfil dos grupos estudados.

Para a escolha dos participante do presente estudo, a inclusão no grupo de homens férteis se estabeleceu principalmente pela comprovação da fertilidade através da confirmação de paternidade prévia de até 2 anos, e para o grupo de homens inférteis o critério utilizado foi a busca pelo serviço de reprodução assistida no Setor de Reprodução Humana do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto (HCRP), além de uma seleção baseada na concentração de espermatozoides progressivos (CTEP < 1 milhão), parâmetro avaliado na análise seminal que

possui correlação com a taxa de gravidez (HAMILTON et al.,2015).

Na primeira etapa do estudo foi realizada uma identificação das amostras e notou-se na classe lipídica a predominância de fosfatidilcolinas (PC) e esfingomielinas (SM), o que demonstra a eficácia do método aplicado (LEBIG et al., 2004; FUCHS; SCHILLER, 2008). Dos 66 metabólitos analisados, 15 espécies lipídicas foram encontradas em comum nos dois grupos de estudo: 12 fosfatidilcolinas e 3 esfingomielinas. A proporção média desses lipídios detectados em estudos anteriores é 60-70% de PC e 30-40% de SM, sendo importante ressaltar que essa relação pode variar de acordo com as condições individuais e estágios de maturação do espermatozoide (POULOS; WHITE, 1973; TAVILANI et al., 2007). Outro fator importante a ser considerado é que, em sua maioria, as análises de perfil lipídico espermático apresentam os dados obtidos na forma de concentração (TAVILANI et al., 2007), e dentre os 15 lipídios encontrados neste estudo, 9 estão em maior concentração no grupo de homens inférteis, são eles PC 34:0, 16:0, 34:2, 38:5, 28:1, 36:2 e SM d18:0/18:1, SM d18:1/16:1, SM d18:0/16:1.

Nesse contexto, nota-se uma escassez de estudos semelhantes dificultando a análise dos dados coletados com base em cada espécie em particular. Dentre os poucos trabalhos encontrados, está um realizado por Engels et al. (2019), utilizando também a análise por espectrometria de massas indireta (LC-MS/MS), no qual foi feita uma investigação direcionada com a finalidade de comparar o perfil metabólico do sêmen e espermatozoides de homens férteis com perfis seminais variados. Os achados indicaram uma correlação positiva com a capacidade de movimento progressivo dos espermatozoides entre 80% das SM e 50% das PC observadas (PC 36:0, 36:5, 36:6, 38:5, 38:6, 40:2, 40:4, 40:5, 42:4, 42:5, e 42:6). Somado a isso, foi descrita uma maior motilidade espermática quando o aumento no grau de insaturação das PC era observada no grupo de homens férteis. Em um outro estudo realizado em 2019 (LOPALCO et al., 2019) através da metodologia conhecida como MALDI-TOF/MS, foi observado um aumento nos fosfolipídios contendo ácidos graxos saturados e monoinsaturados, e paralelamente uma menor quantidade de espécies contendo ácidos graxos poli-insaturados em um grupo de homens inférteis. Como a fluidez da membrana dos espermatozoides está diretamente ligada ao elevado grau de insaturação de ácidos graxos, a conclusão foi que supostamente podia-se correlacionar os dados obtidos com a redução da motilidade espermática na oligoastenozoospermia e destacar o papel do estresse oxidativo em seus mecanismos. Esses resultados foram compatíveis com a maioria dos reportados no presente estudo, com exceção da PC(38:5) que foi encontrada em maior concentração no grupo de homens inférteis. A seguir, discutimos as possibilidades relacionadas com a diferença observada.

As PC são fosfolipídios compostos por uma molécula de colina ligada a um grupo

fosfato e duas cadeias de ácidos graxos não polares. Essas moléculas lipídicas são componentes importantes das membranas dos espermatozoides humanos, desempenhando um papel fundamental na estrutura e funções como uma boa motilidade espermática e capacidade de fertilização (GLANDER et al., 2002; ENGEL et al., 2019). A PC(38:5) é um exemplo de fosfatidilcolina formada por 38 átomos de carbono e 5 insaturações nas cadeias de ácidos graxos, e trata-se de uma espécie lipídica pouco investigada. Porém, um estudo sobre análise lipidômica em tecidos de camundongos (FURSE S et al., 2020), detectou que o PC(38:5) está presente no tecido cardíaco, e que dentro dessa espécie lipídica, existem inúmeras variações de acordo com a composição específica dos ácidos graxos que compõem a sua estrutura, podendo ser encontrada de diferentes formas como PC(16:0/22:5); PC(20:3/18:2) e PC(20:2/18:3). E em decorrência disso, quando a PC(38:5) foi detectada em maiores proporções na configuração de PC(20:3/18:2), observou-se uma quantidade mais abundante desse lipídio em um grupo comparado ao outro (FURSE S et al., 2020). Essas variações na composição da PC(38:5), podem ser uma das causas da diferença encontrada nos níveis dessa espécie lipídica nesse estudo.

Uma outra pesquisa sobre a importância dos lipídios e das enzimas moduladoras de lipídios na linhagem germinativa masculina revelou que a distribuição de ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs) tem sido relatada como variável entre a cabeça e a peça principal da cauda, levando a acreditar que esses lipídios podem modular a motilidade dos espermatozoides através do aumento da fluidez da membrana (WALTERS et al., 2020). Dentre os ácidos graxos citados no estudo, estão o ácido di-homo-gama-linolênico (20:3) e o γ -ácido linolênico (18:3), e ambos estão em níveis significativamente mais elevados em pacientes com quadro de infertilidade (CONNOR et al., 1998; ZALATA et al., 1998). Dentre outros ácidos graxos que podem compor a PC(38:5) nas células espermáticas estão o ácido palmítico (16:0), ácido esteárico (18:0), ácido oleico (18:1), ácido linoleico (18:2), ácido araquidônico(20:4) e o ácido docosahexaenoico(22:6) (FERRAMOSCA, A.; ZARA V, 2022). Todos eles têm sido associados a diferentes aspectos da qualidade e função espermática, como a motilidade, morfologia, concentração, viabilidade e capacidade de fertilização, em sua maioria, de forma positiva. Porém, um estudo realizado em 2019, chamou atenção por abordar o impacto que o ácido araquidônico (20:4) exerce negativamente sobre a motilidade dos espermatozoides, sugerindo que anormalidades na sua rede metabólica podem levar a alterações na via de sinalização e conseqüentemente impactar na fertilidade masculina (YU, L. et al., 2019).

Ao associar as informações sobre as prováveis configurações das PC, torna-se viável para esse estudo a possibilidade de que os ácidos graxos citados acima componham a molécula

de PC(38:2) de diversas formas, e uma vez que já tenham sido detectados em quadros de infertilidade, sejam alvo de uma hipótese para justificar o aumento da concentração de PC(38:5) no grupo de homens inférteis.

Curiosamente, em um trabalho realizado por Engel et al. (2019) observou-se a presença da fosfatidilcolina PC(38:5) na análise do perfil metabolômico, que apresentou características positivas para motilidade, mas em contrapartida, indicou defeitos na morfologia, tanto na cabeça quanto na cauda do espermatozoide (ENGEL et al., 2019). Essa descoberta talvez indique que, embora a presença dessa classe lipídica possa melhorar a motilidade, ela pode também influenciar negativamente na estrutura e a forma dos espermatozoides. Esses resultados destacam a importância de uma análise mais aprofundada dos componentes lipídicos específicos e suas interações com a função espermática. É provável que a configuração molecular PC(38:5) possa desempenhar um papel dual na saúde reprodutiva masculina, apresentando efeitos benéficos ou desafios relacionados a infertilidade.

Além das PC, três subtipos de SM foram encontradas em maior concentração no grupo de homens inférteis, são elas: (SM(d18:1/16:1); SM(d18:0/16:1) e SM(d18:1/18:0)), que em estudos gerais demonstraram grande importância para a composição da membrana celular espermática e desempenham um papel crucial durante os processos de capacitação e reação acrossomal (ZANETTI et al. 2010). Porém uma pesquisa realizada por Butler et al. (2002) revelou que o aumento de esfingomielinas (SM) em ratos com deficiência da enzima esfingomielinase ácida (ASM) resultou em deformações na peça intermediária da membrana dos espermatozoides, afetando de forma negativa sua fluidez, motilidade e a função mitocondrial. Com o propósito de investigar a doença de Niemann-Pick, uma esfingolipidose rara que compromete a atividade enzimática em questão, foi utilizado o modelo (ASM-knock out) que pode auxiliar na compreensão das consequências do acúmulo de SM e outros lipídios nas membranas espermáticas.

Em um trabalho realizado por Rivera-Egea et al. (2019) dez espécies lipídicas diferentes foram detectadas entre os espermatozoides de homens que atingiram ou não uma gravidez após ICSI. Dentre elas, duas esfingomielinas (SM d18:1/20:0 e SM d18:1/24:0) com configurações semelhantes as encontradas nesse estudo, apresentaram notavelmente, uma intensidade relevante no grupo de homens inférteis e que não atingiu a gravidez.

Apesar da dificuldade de interpretação dos resultados frente ao número reduzido de trabalhos similares, o presente estudo apresentou algumas alterações significantes comparadas com estudos anteriores relacionadas aos lipídios encontrados em maior concentração no grupo de homens inférteis, possibilitando que sejam vistos como potenciais alvos de estudos futuros.

Conclusões

7. CONCLUSÕES

Realizou-se a padronização das técnicas de extração lipídica, armazenamento e envio dos extratos lipídicos em temperatura ambiente, assim como da LC-MS/MS e transições MRM para concentrações espermáticas muito baixas. O protocolo utilizado nos permitiu a análise e caracterização de lipídios fornecendo informações interessantes sobre mudanças em 2 classes de fosfolipídios (PC e SM) com abundância relativa aumentada de moléculas com menor grau de insaturação, que permitirão sua utilização em estudos futuros com maiores casuísticas.

Observou-se uma maior concentração de nove lipídios em espermatozóides de homens inférteis, quando comparados aos férteis, sendo seis PC e três SM. A maior parte das diferenças observadas foi consistente com a literatura e contribuiu para uma melhor análise e caracterização de lipídios potencialmente relacionados à infertilidade masculina. No entanto, apesar dos progressos aqui obtidos, serão necessários mais estudos ampliando o número de grupos funcionais analisados, associando essa mesma abordagem com outra, gerando uma análise comparativa a fim de detectar possíveis biomarcadores individuais, sendo as classes lipídicas PC e SM apontadas como os principais alvos.

Referências³

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.

BECKER S. et al. LC-MS-based metabolomics in the clinical laboratory. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2012 Feb 1;883-884:68-75.

BEYGI Z, et al. Role of Oxidative Stress and Antioxidant Supplementation in Male Fertility. *Curr Mol Med*. 2021;21(4):265-282.

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.

CARSON S.A; KALLEN A. N. Diagnosis and Management of Infertility: A Review. *JAMA.* 2021 Jul 6;326(1):65-76. doi: 10.1001/jama.2021.4788. PMID: 34228062; PMCID: PMC9302705.

CHEM M. J. A. et al. Bessant C. Mining proteomic MS/MS data for MRM transitions. *Methods Mol Biol.* 2010;604:187-99.

CRAIG, L. B. et al. Decreased very long chain polyunsaturated fatty acids in sperm correlates with sperm quantity and quality. *J Assist Reprod Genet.* 2019 Jul; 36(7): 1379-1385

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 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 spermogram parameters and the metabolites present in human spermatozoa and seminal plasma. *PLoS One.* 2019 Feb 20;14(2):e0211679.

FERRAMOSCA, A.; ZARA V. Diet and Male Fertility: The Impact of Nutrients and Antioxidants on Sperm Energetic Metabolism. *Int J Mol Sci.* 2022 Feb 25;23(5):2542.

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.

FLESCH, 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 feloidea 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.

GAVRIZI, S, Z, et al. Sperm very long-chain polyunsaturated fatty acids: relation to semen parameters and live birth outcome in a multicenter trial. *Fertil Steril*. 2023 May;119(5):753-760.

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 JUrol*. 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.

HERNÁNDEZ-SILVA .G et al. Proteomic characterization of human sperm plasma membrane-associated proteins and their role in capacitation. *Andrology*. 2020 Jan;8(1):171-180.

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.

JUNGWIRTH A. et al. European Association of Urology Working Group on Male Infertility. European Association of Urology guidelines on Male Infertility: the 2012 update. *Eur Urol.* 2012 Aug;62(2):324-32.

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.

LI J, ZHU H. J. Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS)-Based Proteomics of Drug-Metabolizing Enzymes and Transporters. *Molecules.* 2020 Jun 11;25(11):2718.

LI K, et al. Development and validation of an LC-MS/MS method for the quantification of fascin proteins in human serum. *Bioanalysis.* 2022 Aug;14(16):1095-1109.

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.

LOPALCO, P. et al. Alteration of Cholesterol Sulfate/Seminolipid Ratio in Semen Lipid Profile of Men With Oligoasthenozoospermia. *Frontiers in Physiology.* 2019 10

LÓPEZ-BASCON M. A et al. Development of a qualitative/quantitative strategy for comprehensive determination of polar lipids by LC-MS/MS in human plasma. *Anal Bioanal Chem.* 2020 Jan;412(2):489-498.

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 acrosomereaction. *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.

SCHUFFNER, A. et al. Apoptosis and lipid peroxidation before and after cryopreservation. *Reprod Clim*. 2008; 23(4):176-84

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.

VASAN S. S. Semen analysis and sperm function tests: How much to test? *Indian J*

Urol. 2011 Jan;27(1):41-8

WHO. Report of the meeting on the prevention of infertility at the primary health care level. Geneva: World Health Organization; 2010.

WHO. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. (6th ed) Geneva: World Health Organization; 2021.

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.

YU, L. et al. Abnormal arachidonic acid metabolic network may reduce sperm motility via P38 MAPK. *Open Biol.* 2019 Apr 26;9(4):180091.

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 lipídica de espermatozoides de homens férteis e homens inférteis com oligoastenozoospermia”.

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 Marília Alves certificaram-me de que todos os dados desta pesquisa serão confidenciais. Em caso de dúvidas poderei chamar a pesquisadora Paula Andrea Navarro e/ou Marília Alves 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 lipídica de espermatozoides de homens férteis e homens inférteis com oligoastenozoospermia”.

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 Marília Alves certificaram-me de que todos os dados desta pesquisa serão confidenciais. Em caso de dúvidas poderei chamar a pesquisadora Paula Andrea Navarro e/ou EMarília Alves 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 |
|------|--------------------------|------|