



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE ZOOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

LUANA MARA SILVA DE CASTRO PACHECO DA CUNHA

**PERFIL ANTROPOMÉTRICO E ANÁLISE PROTEÔMICA DO PLASMA
SEMINAL: ESTRATÉGIA PARA IDENTIFICAÇÃO DE MARCADORES
MOLECULARES DA FERTILIDADE EM HOMENS ATENDIDOS EM UM CENTRO
DE REFERÊNCIA EM MEDICINA REPRODUTIVA EM FORTALEZA, CEARÁ.**

FORTALEZA

2023

LUANA MARA SILVA DE CASTRO PACHECO DA CUNHA

PERFIL ANTROPOMÉTRICO E ANÁLISE PROTEÔMICA DO PLASMA SEMINAL:
ESTRATÉGIA PARA IDENTIFICAÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES DA
FERTILIDADE EM HOMENS ATENDIDOS EM UM CENTRO DE REFERÊNCIA EM
MEDICINA REPRODUTIVA EM FORTALEZA, CEARÁ.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Biotecnologia. Área de Concentração: Reprodução humana.

Orientador: Prof. Dr. Arlindo de Alencar Araripe Noronha Moura.
Coorientadora: Profa. Dra. Denise Damasceno Guerreiro.

FORTALEZA

2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- C978p Cunha, Luana Mara Silva de Castro Pacheco da.
Perfil antropométrico e análise proteômica do plasma seminal : estratégia para identificação de marcadores moleculares da fertilidade em homens atendidos em um centro de referência em medicina reprodutiva em Fortaleza, Ceará / Luana Mara Silva de Castro Pacheco da Cunha. – 2023.
186 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia de Recursos Naturais, Fortaleza, 2023.
Orientação: Prof. Dr. Arlindo de Alencar Araripe Noronha Moura.
Coorientação: Profa. Dra. Denise Damasceno Guerreiro.
1. Infertilidade masculina. 2. Obesidade. 3. Circunferência da cintura. 4. Plasma seminal. 5. Varicocele. I. Título.
-

CDD 660.6

LUANA MARA SILVA DE CASTRO PACHECO DA CUNHA

PERFIL ANTROPOMÉTRICO E ANÁLISE PROTEÔMICA DO PLASMA SEMINAL:
ESTRATÉGIA PARA IDENTIFICAÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES DA
FERTILIDADE EM HOMENS ATENDIDOS EM UM CENTRO DE REFERÊNCIA EM
MEDICINA REPRODUTIVA EM FORTALEZA, CEARÁ.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Biotecnologia. Área de Concentração: reprodução humana.

Aprovada em: 27/06/2023.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Arlindo de Alencar Araripe Noronha Moura (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Denise Damasceno Guerreiro (Coorientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Ana Cristina de Oliveira Monteiro Moreira
Universidade de Fortaleza (Unifor)

Profa. Dra. Carla Soraya Costa Maia
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

Profa. Dra. Ana Paula Ribeiro Rodrigues
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

A Deus. Aos meus pais, Romildo e Julieta (*In
memorian*). Aos amores de vida, Rivadávia e
Gabriela.

AGRADECIMENTOS

A Deus, centro da minha vida e luz do meu caminho.

A Nossa Senhora das Graças, minha advogada e mãe.

Ao meu Anjo da Guarda, meu zeloso guardador, que sempre me rege, me guarda, me protege, me guia e me ilumina. Amém!

Ao Padre Pio de Pietrelcina, meu Pai espiritual e intercessor junto a Jesus.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia – RENORBIO, pela oportunidade de realização desta conquista.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Arlindo Moura pela paciência e competência. Agradeço pelas sugestões, correções e orientação em tempos desafiadores que exaltaram a vontade de vencer em prol da ciência.

À minha coorientadora, Denise Damasceno Guerreiro, pela ajuda, correções de artigos, respeito e dedicação. Além da grande contribuição profissional e científica, sua alma leve, bondosa e empática com “olhar humanizado” nas atitudes, gestos e condutas edificaram o meu saber em ciência. Meu coração será profundamente grato a ela por não desistir de mim. Deus lhe pague!

Aos participantes desta pesquisa pela generosidade em doar um pouco de si em prol da ciência e elucidação da infertilidade masculina.

Ao meu grande amigo, Evangelista Torquato, pelo apoio e confiança, mas sobretudo o meu reconhecimento pelo trabalho desenvolvido em prol da reprodução humana que transforma a ciência em vida, o sonho em realidade e o desejo de ser pai e mãe na mais complexa, inesquecível e admirável viagem de esperança!

Aos integrantes do Grupo de Estudo em Análise Proteômica (GEAP), Messilyana de Oliveira Mesquita, Alexandre Danton Viana Pinheiro e Fábio Roger Vasconcelos, minha eterna gratidão pela colaboração na fase de coleta e processamento das amostras.

Aos andrologistas da BIOS – Centro de Medicina Reprodutiva, Andrea Mesquita Lima, Gleicyane Sousa dos Santos e Eduardo Gomes Sá pelo acolhimento e por toda ajuda nas análises no laboratório de andrologia.

Às colaboradoras da BIOS – Centro de Medicina Reprodutiva, Suyane Moura Lima Araújo e Dona Francisca Souza dos Santos por toda a ajuda na abordagem aos participantes e na reserva do local adequado para as entrevistas.

Aos colaboradores do Centro de Reprodução Humana Evangelista Torquato pelo apoio e ajuda nas informações dos clientes e disponibilidade em todas as etapas da pesquisa de campo.

Ao assessor do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia (RENORBIO), Antônio Adil de Oliveira, pela generosidade e disponibilidade em ajudar nas mais diversas atividades administrativas.

Ao meu esposo Rivadavia, que me ama, ampara e protege; e a quem também amo intensamente, “doutor das coisas do meu coração”.

À minha filha Gabriela, meu amor incondicional e razão da minha luta pela vida que, apesar de tão pouca idade, teve paciência em entender que o fim, muitas vezes, é o começo de tudo.

À minha mãe Julieta (*In memoriam*), que tanto me incentivou nessa empreitada. Gostaria de sentir seu abraço e contemplar seu sorriso, mas não será possível. A Ela, minha eterna fonte de inspiração, força, resiliência e amor. A Ela, mais viva dentro de mim do que eu poderia imaginar, a quem Deus guarda no melhor lugar do céu!

Ao meu pai Romildo pelo apoio, amor e paciência. Carrega no seu coração as marcas de uma vida de muito trabalho, dedicação à família e grandes vitórias que me orgulham profundamente. Você é a música que toca em meu coração!

Aos meus irmãos Romildo e Paulo, a base das “Três Xícaras”. Juntos somos mais fortes.

Aos meus familiares, parentes e amigos pela “força e incentivo” nos momentos difíceis e de grande combate.

A Ana Daltro, companheira de trabalho e amiga-irmã. Combatemos um grande combate e fomos vitoriosas. Obrigada pelo apoio, risadas, abraços, conselhos e presença constante na minha família. “Você é Top das Galáxias” *Love you!*

Aos amados Camillinha e Dandan, um presente que Deus me concedeu em vida, e Bebellzinha, amor da Dinda, que trouxe alegria e renovação: *You Raise me Up!*

À minha grande mestra, Carla Soraya Costa Maia pelo incentivo, companheirismo e torcida, sempre e eternamente presente no meu coração. Nela encontro tudo o que admiro na docência: coerência e competência científica. Somado a isso, é um ser humano forte com elevada espiritualidade, inteligência emocional e amor no que faz. Sou, portanto, “*Sorayete*”!

À Profa. Ana Cristina Moreira de Oliveira Monteiro Moreira pela parceria na análise proteômica mesmo diante de tantas adversidades, sempre nos recebeu com positividade, otimismo e disponibilidade em ajudar. Agradeço de coração.

À equipe do laboratório de Fisiologia Animal do Departamento de Zootecnia e do Núcleo de Pesquisas e Desenvolvimento de Medicamentos (NPDM) pela ajuda nas análises proteômicas.

Ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Saúde (PPGNS), minha eterna gratidão pela formação que deram início a minha caminhada como docente.

Ao Curso de Nutrição da Universidade de Fortaleza (Unifor) pelo apoio na construção desse sonho.

Aos membros participantes da banca examinadora, Profa. Dra. Ana Cristina Moreira de Oliveira Monteiro Moreira, Profa. Dra. Carla Soraya Costa Maia e Profa. Dra. Ana Paula Ribeiro Rodrigues pela valorosa contribuição e enriquecimento para a melhoria do nosso trabalho.

Finalmente, agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para que esse trabalho fosse realizado com excelência. Deus lhes pague!

“A infertilidade é de fato um problema de saúde pública com sérios reflexos na vida daqueles que estão acometidos desta condição”.
(SILVA, 2021, p.10)

RESUMO

A infertilidade masculina representa um problema de saúde pública com repercussões negativas à saúde masculina sendo a obesidade central e varicocele, fatores de risco que levam a alterações seminais significativas, impossibilitando uma gestação. Neste sentido, a presente tese teve dois objetivos: 1) avaliar a associação entre os marcadores antropométricos (IMC, CC) e parâmetros clínicos, incluindo o estilo de vida de homens em tratamento reprodutivo e 2) identificar biomarcadores para infertilidade masculina a partir da caracterização proteômica do plasma seminal de homens atendidos numa clínica de reprodução assistida. Participaram do estudo 117 homens atendidos no centro de medicina reprodutiva no período de outubro de 2019 a março de 2020. Peso (kg) e circunferência da cintura (cm) foram mensurados e aplicado um formulário socioeconômico e estilo de vida. Foi realizada coleta do sêmen para obtenção do laudo seminal e análise proteômica. Na pesquisa 1, 98 participantes foram divididos em três grupos e categorizados pelo IMC, a saber: eutrófico ($n = 14$), sobrepeso ($n = 56$) e obesidade ($n=28$). A média de idade foi de 37,8 (6,8) anos e a CC de 96,3 (15,3) cm. Houve associação significativa entre grupos IMC e CC ($p<0,001$), IMC e doenças familiares ($p=0,017$), destacando obesidade ($p=0,017$) e diabetes ($p=0,008$), bem como uso de medicamentos ($p=0,049$). Para a pesquisa 2, focamos na análise proteômica onde 19 homens com média de idade de 35,9 (6,4) anos divididos em 4 grupos, normozoospermicos (NZ) ($n=5$), varicocele e astenozoospermia (VAZ) ($n=4$), varicocele e teratozoospermia (VTZ) ($n=4$) e, varicocele e oligoteratozoospermia (VOTZ) ($n=6$). Foram identificadas 4.245 proteínas no plasma seminal, 724 delas no grupo NZ, com destaque para as mais abundantes ANX A3, PRDX1 e CRAC1. Em seguida, o grupo VAZ com 886 proteínas com destaque para IGLC3, IGLC1 e H2BC1, o grupo VOTZ com 907 proteínas, com destaque para TUBB, MSLN e HEX e o grupo VTZ, com 1728 proteínas, nas quais HSPA1, KIF5C e CLTCL1, identificadas como as mais abundantes. Este estudo forneceu a associação do IMC e doenças familiares e uso de medicamentos, bem como a primeira caracterização do proteoma do plasma seminal de homens com parâmetros seminais normais e varicocele, na qual foi possível identificar proteínas e vias associadas à espermatogênese, metabolismo energético, fertilização, permeabilidade do trato reprodutivo e imunofertilidade.

Palavras-chave: infertilidade masculina; obesidade; circunferência da cintura; plasma seminal; varicocele; proteômica.

ABSTRACT

Male infertility represents a public health problem with negative repercussions on male health, with central obesity and varicocele being risk factors that lead to significant seminal changes, making pregnancy impossible. In this sense, this thesis had two objectives: 1) to evaluate the association between anthropometric markers (BMI, WC) and clinical parameters, including the lifestyle of men undergoing reproductive treatment and 2) to identify biomarkers for male infertility based on the characterization Proteomics of seminal plasma from men attended at an assisted reproduction clinic. The study included 117 men attended at the reproductive medicine center from October 2019 to March 2020. Weight (kg) and waist circumference (cm) were measured and a socioeconomic and lifestyle form was applied. Semen collection was performed to obtain the seminal report and proteomic analysis. In research 1, 98 participants were divided into three groups and categorized by BMI, namely: eutrophic ($n = 14$), overweight ($n = 56$) and obese ($n = 28$). The mean age was 37.8 (6.8) years and the WC was 96.3 (15.3) cm. There was a significant association between BMI and WC ($p < 0.001$), BMI and family diseases ($p = 0.017$), highlighting obesity ($p = 0.017$) and diabetes ($p = 0.008$), as well as medication use ($p = 0.049$). For research 2, we focused on the proteomic analysis where 19 men with a mean age of 35.9 (6.4) years were divided into 4 groups, normozoospermic (NZ) ($n = 5$), varicocele and asthenozoospermia (VAZ) ($n = 4$), varicocele and teratozoospermia (VTZ) ($n = 4$) and, varicocele and oligoteratozoospermia (VOTZ) ($n = 6$). 4,245 proteins were identified in seminal plasma, 724 of them in the NZ group, with emphasis on the most abundant ANX A3, PRDX1 and CRAC1. Then, the VAZ group with 886 proteins with emphasis on IGLC3, IGLC1 and H2BC1, the VOTZ group with 907 proteins, with emphasis on TUBB, MSLN and HEX and the VTZ group, with 1728 proteins, in which HSPA1, KIF5C and CLTCL1, identified as the most abundant. This study provided the association of BMI and familial diseases and medication use, as well as the first characterization of the seminal plasma proteome of men with normal seminal parameters and varicocele, in which it was possible to identify proteins and pathways associated with spermatogenesis, energy metabolism, fertilization, permeability of the reproductive tract and immunofertility.

Keywords: male infertility; obesity; circumference waist; seminal plasma; varicocele; proteome.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Mapa mundial contendo porcentagens de casos de infertilidade por região devido ao fator masculino entre as regiões estudadas. A Ásia inclui toda a Rússia.....	21
Figura 2	Representação das partes constituintes de um espermatozoide humano	39
Figura 3	Fluxograma da pesquisa.....	52
Figura 4	BMI de homens com diferentes diagnósticos de fertilidade em centro de medicina reprodutiva. As médias foram comparadas através de ANOVA ou teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunnet ($p < 0,05$). NZ: normozoospermia; VAZ: varicocele + astenozoospermia; VTZ: varicocele + teratozoospermia; VOTZ: varicocele + oligoteratozoospermia.....	128
Figura 5	Parâmetros seminais de homens com diferentes diagnósticos de fertilidade em centro de medicina reprodutiva. As médias foram comparadas através de ANOVA ou teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunnet ($p < 0,05$). NZ: normozoospermia; VAZ: varicocele + astenozoospermia; VTZ: varicocele + teratozoospermia; VOTZ: varicocele + oligoteratozoospermia.....	129
Figura 6	Diagrama de Venn representando os números de proteínas identificadas no plasma seminal de homens com diferentes diagnósticos de fertilidade. NZ: normozoospermia; VAZ: varicocele + astenozoospermia; VTZ: varicocele + teratozoospermia; VOTZ: varicocele + oligoteratozoospermia.....	130
Figura 7	Rede de interação proteína-proteína (GeneMANIA) (A) ANXA3, PRDX1 e CRAC1, (B) HSPA1B, KIF5C e CLTCL1, (C) H2BC1 e (D) MSLN e HEXB.	131
Figura 8	Grupos funcionais e vias de sinalização associados às proteínas do plasma seminal de homens diferentes diagnósticos de fertilidade. NZ (A e B): normozoospermia; VTZ (C e D): varicocele + teratozoospermia; VAZ (E e F):	133

varicocele + astenozoospermia; VOTZ (G e H): varicocele + oligoteratozoospermia. Análises realizadas através da plataforma Metascape..

Figura 9A	Análise de enriquecimento de rede e conjunto de genes de miRNAs associados à regulação dos genes codificantes das proteínas ANXA3 e PRDX1 identificadas em homens diagnosticados como normozoospermia (NZ). Análises realizadas na plataforma miRNet.....	138
Figura 9B	Análise de enriquecimento de rede e conjunto de genes de miRNAs associados à regulação dos genes codificantes das proteínas KIF5C e HSPA1B identificadas em homens diagnosticados com varicocele + teratozoospermia (VTZ). Análises realizadas na plataforma miRNet.....	139
Figura 9C	Análise de enriquecimento de rede e conjunto de genes de miRNAs associados à regulação dos genes codificantes da proteína H2BA (C) identificadas em homens diagnosticados com varicocele + teratozoospermia (VAZ). Análises realizadas na plataforma miRNet.....	140
Figura 9D	Análise de enriquecimento de rede e conjunto de genes de miRNAs associados à regulação dos genes codificantes da proteína MSLN (D) identificadas em homens diagnosticados com varicocele + oligoteratozoospermia (VOTZ). Análises realizadas na plataforma miRNet.....	141

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Parâmetros de avaliação para o exame do sêmen humano de acordo com a recomendação da Organização Mundial de Saúde (2021a).....	32
Tabela 2	Diagnóstico laboratorial (concentração, motilidade e morfologia) de acordo com a recomendação da Organização Mundial de Saúde (2021a).....	33
Tabela 3	Visão geral das principais proteínas, características, substratos e funções das glândulas sexuais acessórias.....	35
Tabela 4	Lista e funções de algumas proteínas presentes no plasma seminal humano.....	37
Tabela 5	Regulação das proteínas no plasma seminal humano de acordo com o diagnóstico laboratorial.....	45
Tabela 6	Idade, peso, estatura, circunferência da cintura, índice de massa corporal e classificação nutricional de homens com diferentes diagnósticos de fertilidade atendidos em um centro de medicina reprodutiva, por grupo.....	142
Tabela 7	Lista das 15 proteínas mais abundantes identificadas no grupo normozoospermico (NZ).....	143
Tabela 8	Lista das 15 proteínas mais abundantes identificadas no grupo varicocele astenozoospermico (VAZ).....	144
Tabela 9	Lista das 15 proteínas mais abundantes identificadas no grupo varicocele oligoteratozoospermico (VOTZ).....	145
Tabela 10	Lista das 15 proteínas mais abundantes identificadas no grupo varicocele teratozoospermico (VTZ).....	146
Tabela 11	Principais funções dos microRNAs envolvidos na regulação dos genes ANXA3, PRDX1, HSPA1B, KIF5C, H2BA e MSLN com base nos maiores valores de P obtidos do banco de dados miRNet.....	147

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATP	Adenosina trifosfato
BMPs	Proteínas morfogenéticas ósseas
CaCl ₂	Cloreto de cálcio
CRAC1	Cartilagem ácida proteína 1
DCNT	Doenças crônicas não transmissíveis
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ERO	Espécie reativa de oxigênio
FSH	Hormônio folículo-estimulante
FTMS	<i>Fourier transform mass spectrometry</i>
HEX	Beta-N-acetilhexosaminidase
H2BC1	Histona H2B tipo 1 A
HSPA1	Proteína 1 de choque térmico de 70 kDa
ICSI	Injeção intracitoplasmática de espermatozoide
IDUA	Alfa-L-iduronidase
IgG	Imunoglobulina G
IGLC3	Imunoglobulina lambda constant 7
IGLC1	Imunoglobulina lambda como fator polipetídeo5
IgM	Imunoglobulina M
IUI	Inseminação intra-uterina
KEGG	Kyoto encyclopedia of genes and genomes
KIF5C	Isoforma da cadeia pesada de cinesina
LC	<i>Liquid chromatography</i> / Cromatografia líquida
LOC782966	Tubulina alfa
LH	Hormônio Luteinizante
mRNA	RNA mensageiro
mi-RNAs	Micro-RNAs/ Pequenos RNAs não-codificantes
MS	<i>Mass spectrometry</i> / Espectrometria de massas
MALDI-MS	<i>Matrix assisted laser dissociation ionization</i> – Ionização por dissociação a laser assistida por matrix
MSLN	Mesotelina
NADPH	Fosfato de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida

PASEF MS/MS	Acumulação paralela – Fragmentação serial
PBS	Solução salina tamponada com fosfato
PDI	Proteína disulfide isomerase
PRDX1	Peroxiredoxina-1
RNA	Ácido ribonucleico
SisEmbrio	Sistema nacional de produção de embriões
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
TGF β 2	Fator de crescimento beta 2
TUBB	Tubulina de cadeia beta
UniProtKB	<i>Uniprot KnowledgeBase</i>

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
~	Aproximadamente
<	Menor
°	Graus
°C	Grau celsius
μM	Micromolar
H	Hora
kV	Kilovolt
M	Molar
m/z	Massa/carga
Mg	Miligrama
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimolar
pH	Potencial hidrogeniônico
v/v	Volume/volume
w/w	Weight by weight
μg	Micrograma
μL	Microlitro
μm	Micrômetro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
1.1	Infertilidade Masculina.....	18
1.2	Epidemiologia da Infertilidade Masculina	20
1.3	Etiologia da Infertilidade Masculina	22
1.4	Fisiopatologia da Infertilidade Masculina	25
1.5	Parâmetros Seminais na Fer-tilidade Masculina	30
1.6	Plasma Seminal	34
1.7	Espermatozoide	38
1.8	Proteômica e Fertilidade Masculina	41
1.9	Justificativa	46
2	HIPÓTESES CIENTÍFICAS	49
3	OBJETIVOS	50
3.1	Objetivos Gerais	50
3.2	Objetivos Específicos	50
4	FLUXOGRAMA DA PESQUISA.....	51
5	CAPÍTULO I: ASSOCIATIONS AMONG BODY MASS INDEX, WAIST CIRCUMFERENCE, LIFESTYLE, HEALTH AND SEMEN QUALITY OF MEN TREATED AT A REFERENCE CENTER FOR ASSISTED REPRODUCTION IN FORTALEZA, BRAZIL.....	53
6	CAPÍTULO II: ANÁLISE PROTEÔMICA DO PLASMA SEMINAL DE HOMENS FÉRTEIS E COM VARICOCELE NO NORDESTE, FORTALEZA, BRASIL.....	78
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	156
	REFERÊNCIAS	157
	APÊNDICE A – FOLDER EXPLICATIVO DA PESQUISA.....	173
	APÊNDICE B – FORMULÁRIO SOCIOECONÔMICO, ANTROPOMÉTRICO E BIOQUÍMICO	174
	ANEXO A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO..	177

ANEXO B – PARECER CONSUSBTANCIADO DO COMITÊ DE ÉTICA E PESQUISA.....	182
ANEXO C – CARTA DE ANUÊNCIA DA BIOS – CENTRO DE MEDICINA REPRODUTIVA	183
ANEXO D – CARTA DE ANUÊNCIA DO CENTRO DE REPRODUÇÃO HUMANA EVANGELISTA TORQUATO.....	184
ANEXO E – FICHA DE COLETA SEMINAL DA BIOS – CENTRO DE MEDICINA REPRODUTIVA.....	185

1 INTRODUÇÃO

1.1 Infertilidade Masculina

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) e o Comitê Internacional de Monitoramento em Tecnologias de Reprodução Assistida (ICMART), a infertilidade é conceituada como a incapacidade de concepção de um casal ao longo de 12 meses ou mais com relações sexuais desprotegidas sem uma concepção ou uma gravidez a termo (WHO, 2018; ZEGERS-HOCHSCHILD *et al.*, 2017; BOIVIN *et al.*, 2007). Segundo Piato (1997) é considerado infertilidade sem causa aparente, o casal tentante que após dois anos não consegue uma gravidez a termo, apesar de terem uma avaliação clínica normal.

Com objetivo de estimar a prevalência da infertilidade primária e secundária em mulheres entre 1990 a 2010, uma pesquisa demográfica e de saúde reprodutiva realizada em 190 países e territórios (Europa Central/Oriental e Ásia Central, Leste Asiático/Pacífico, América Latina/Caribe, Norte da África/Oriente Médio, África Subsaariana e Sul da Ásia) considerou como definição de infertilidade a ausência de gravidez ao longo de cinco anos em virtude de suas características epidemiológicas (MASCARENHAS *et al.*, 2012).

Os dados mencionados sobre o número de procedimentos em reprodução assistida no Brasil e o número de embriões congelados são baseados em informações da Rede Latino-Americana de Reprodução Assistida (REDLARA) e nos relatórios de produção de embriões (SisEmbrio) de 2018 e 2019. De acordo com esses dados, em 2018, o Brasil realizou 44.705 ciclos de fertilização *in vitro* (FIV) nos 161 Centros de Reprodução Humana Assistida (CRHA) registrados. Em relação ao número de embriões congelados, houve um aumento de 13% em 2019 em comparação ao ano anterior. No Brasil, o total de embriões congelados em 2019 foi de 100.380 embriões. Os estados de São Paulo, Minas Gerais e Rio de Janeiro foram os que registraram os maiores números de embriões congelados. São Paulo liderou com 21.204,

representando 21,1% do total. Minas Gerais e Rio de Janeiro seguiram com 4.312 (4,3%) e 4.095 (4,1%) embriões congelados, respectivamente. O Ceará apresentou um número de 3.181 embriões congelados, representando 3,2%, do total de embriões congelados no Brasil (ANVISA, 2019).

A inseminação intrauterina (IIU), injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI), fertilização *in vitro* (FIV), transferência de embrião congelado (TEC), teste genéticos pré-implantação, preservação de gametas e ciclos de sêmen constituem as técnicas mais comuns de reprodução assistida (TRA). Essas técnicas de reprodução são extremamente robustas e individualizadas tanto em relação aos medicamentos prescritos quanto ao tratamento instituído, pois dependem da elucidação do diagnóstico, tipo da infertilidade (masculina e/ou feminina), idade, número de tentativas e principalmente das condições socioeconômicas e clínicas do casal (ZEGERS-HOCHSCHILD *et al.*, 2017).

A saúde masculina tem um importante papel na reprodução humana e elucidar as causas e fatores que levam a infertilidade masculina são importantes para compreender a busca por tratamentos especializados (CHEN *et al.*, 2023; OKONOFUA *et al.*, 2022). As descobertas recentes de biomarcadores podem identificar a etiologia da infertilidade masculina de forma minimamente invasiva. Outras abordagens estão sendo investigadas, como a análise de proteínas específicas no plasma seminal, bem como avaliação de marcadores epigenéticos, como metilação do DNA para compreender melhor os mecanismos subjacentes à infertilidade masculina (KRZASTEK; SMITH; KOVAC, 2020).

Através da análise proteômica, é possível identificar e quantificar diferentes proteínas presentes no plasma seminal, bem como analisar suas modificações pós-traducionais e interações proteína-proteína. Isso pode levar a descoberta de biomarcadores específicos, que podem ajudar na detecção precoce de condições que causam infertilidade masculina. Além disso, a análise comparativa proteômica entre os grupos férteis e inférteis pode revelar

diferenças significativas nas vias biológicas e nos perfis proteômicos associados à infertilidade. (JODAR; SOLER-VENTURA; OLIVA, 2017).

Com intuito de aprofundar o tema investigado nesta tese, a revisão de literatura a seguir abordará a epidemiologia, etiologia da infertilidade masculina, destacando a fisiopatologia, os parâmetros seminais, o plasma seminal e estudos na área da proteômica.

1.2 Epidemiologia da Infertilidade Masculina

A prevalência da infertilidade ainda é um método difícil de mensurar em virtude da redução de estudos científicos, ampla variação geográfica, barreiras socioeconômicas e culturais que representam com fidelidade o fator masculino. Estima-se que 10 a 15% dos casais apresentam dificuldade de concepção, o que corresponde a aproximadamente 190 milhões de pessoas no mundo que lutam contra a infertilidade, sendo que 50% dessas causas estão voltadas aos fatores masculinos (APARICIO PRIETO *et al.*, 2022; ZEGERS-HOCHSCHILD *et al.*, 2017; BIENIEK; DRABOVICH; LO, 2016).

Uma revisão sistemática e estudo de meta-análise de Agarwal *et al.* (2015a) investigou 16 artigos sobre a epidemiologia da infertilidade mostrando uma variação de 20% a 70% dos fatores ligados a fatores masculinos. Sabe-se que esses dados específicos por região não são facilmente obtidos, por questões culturais, pela ausência de pesquisas populacionais, subnotificações e por não ser considerada uma doença. Na Figura 1, observarmos os grandes celeiros da infertilidade masculina, como: Oriente Médio (60 a 70%), Europa Central (56%), América do Sul (52%), América do Norte e Europa Ocidental (50%), África Subsaariana (43%), Oceania e Arquipélago Malayo (40%), e Ásia (37%).

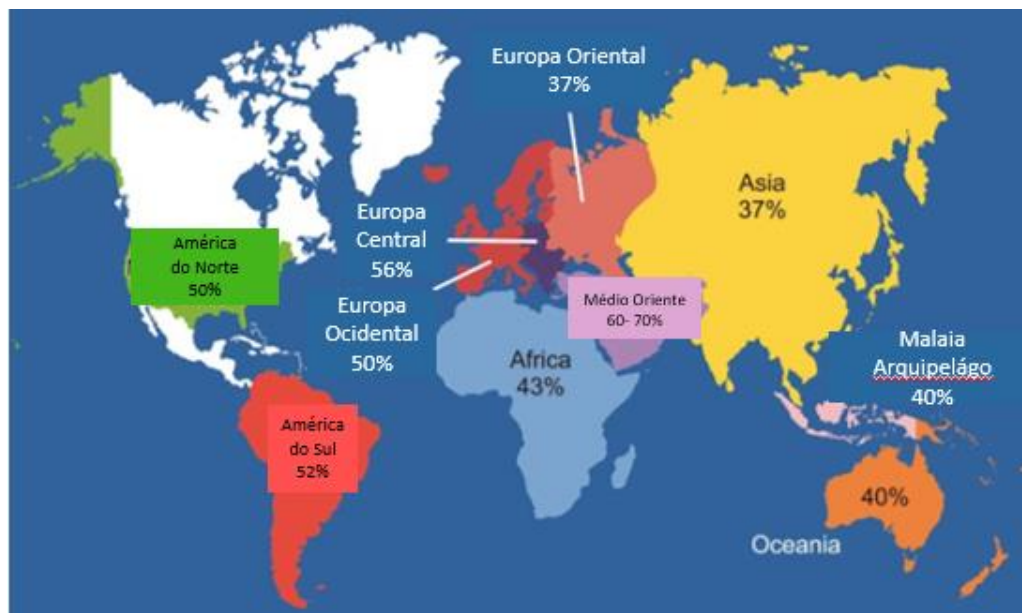


Figura 1. Mapa mundial contendo porcentagens de casos de infertilidade por região devido ao fator masculino entre as regiões estudadas. A Ásia inclui toda a Rússia. Fonte: Agarwal (2015a).

De acordo com o *Center for Disease Control and Prevention* (CDC), nos Estados Unidos estima-se uma prevalência de infertilidade entre 9 a 14% dos homens em idade reprodutiva na faixa etária de 15 a 49 anos (MARTINEZ; DANIELS; CHANDRA, 2018; LOUIS *et al.*, 2013). Dados mundiais apontam que existem 190 milhões de pessoas inférteis que procuram assistência médica, o que corresponde a mais de 48 milhões de casais (AGARWAL *et al.*, 2019). Em 2022, relatórios da OMS relataram que 1 a cada 6 pessoas no mundo são inférteis. Esses dados apoiam o desenvolvimento de políticas públicas e práticas para minimizar problemas relacionados com a saúde reprodutiva do casal (WHO, 2023).

No Brasil, pesquisa de Santos *et al.* (2008) mostrou que existem mais de 5 milhões de casais inférteis. A prevalência da infertilidade primária é menor (1,5 a 2,6%) do que a secundária (7,2 a 18%). Esta última se caracteriza quando o casal em união estável de cinco anos consegue, pelo menos uma gravidez, mas depois disso não engravida sem nenhum método contraceptivo (AGARWAL *et al.*, 2015b). A prevalência da infertilidade primária é menor (1,5

a 2,6%) do que a secundária (7,2 a 18%). Esta última se caracteriza quando o casal possui união estável de cinco anos e consegue, pelo menos uma gravidez, mas depois disso não engravida sem nenhum método contraceptivo (AGARWAL *et al.*, 2015b).

Em 2010, o Ministério da Saúde (MS) observou por meio dos dados do Sistema de Informações Ambulatoriais do Sistema Único de Saúde (SIA/SUS) que a média anual de consultas médicas de homens/idade foi de 0,06 entre 20 a 59 anos, um número considerado baixo quando comparado às mulheres que foi de 4,33 nessa mesma faixa etária. As principais queixas desse atendimento foram alterações na próstata, disfunção erétil, infecções urogenitais, cálculos urinários e doenças testiculares que são sintomas clínicos que impactam diretamente a fertilidade masculina (RAMOS *et al.*, 2021; SOUSA, 2020).

Em 2012, a OMS discutiu as principais questões que poderiam identificar a infertilidade masculina, dentre elas, a prevalência e a proporção da infertilidade do casal atribuída ao homem, avaliação clínica completa, parâmetros seminais indicativos para terapia de reprodução assistida, estilo de vida, uso de suplementos orais e antioxidantes, rastreamento genético, histórico ou não de neoplasias e o impacto da varicocele (BARRATT *et al.*, 2017; LEVINE *et al.*, 2017).

1.3 Etiologia da Infertilidade Masculina

A etiologia da infertilidade masculina é multifatorial e representada por cerca de 30% a 80% dos casos relacionados ao estresse oxidativo, no entanto outros estudos relacionam diretamente o fator idade como prejuízo na qualidade do sêmen. Os espermatozoides são alvos das espécies reativas de oxigênio (EROs), tais como, o ânion superóxido (O_2^-), ânion hidroxila (OH^-) e superóxido de hidrogênio (H_2O_2). Possuem uma membrana constituída por ácidos graxos poliinsaturados, altamente reativos e um sistema antioxidante ineficaz (AGARWAL *et al.*, 2021a; TAKESHIMA *et al.*, 2017; SAMPLASKI; NANGIA, 2015; AGARWAL *et al.*,

2014). Portanto, a produção das EROs tem alta relevância na reprodução humana devido ao desequilíbrio oxidativo que leva dano ao DNA, peroxidação lipídica, destruição do sistema antioxidante e apoptose espermática precoce (RITCHIE; KO, 2021).

Algumas alterações laboratoriais nos parâmetros seminais são observadas como consequência do estresse oxidativo. A peroxidação lipídica e o aumento dos níveis de malondialdeído no plasma seminal presentes em homens inférteis, reduziram a concentração, motilidade e morfologia do espermatozoide, acarretando um quadro de oligoastenoteratozoospermia (HOSSEINZADEH; KARIMI; JORSARAEI, 2013).

Além disso, a quantidade excessiva das EROs altera as características do espermatozoide acarretando mudanças nos parâmetros seminais como redução da concentração, motilidade e morfologia, aumento da fragmentação e compactação do DNA, e apoptose espermática. Diante disso, patologias clínicas são frequentemente diagnosticadas, como a varicocele e a leucocitospermia com repercussões negativas para a fertilidade masculina (KOVAC; PASTUSZAL; LAMB *et al.*, 2013; MOURA *et al.*, 2011).

Por outro lado, baixos níveis de EROs potencializam a fertilidade masculina e são ideais para fertilização, aquisição da motilidade, capacitação espermática e reação acrossômica, facilitando a condensação nuclear no grupo tiol da protamina, fosforilação da tirosina e ligação com a zona pelúcida (RITCHIE; KO, 2021; MILARDI *et al.*, 2012). Agarwal e colaboradores (2019) propuseram uma recomendação clínica para identificar o estresse oxidativo em homens inférteis sem causa aparente chamado de método *Male Oxidative Stress Infertility* (MOSI). Essa metodologia utilizou o sistema oxidativo na infertilidade masculina (MiOXSYS) que avaliou o potencial redox de amostras de sêmen e plasma seminal de homens inférteis em tempo controlado (< 120 minutos). Esses resultados mostraram-se satisfatórios tanto ao diagnóstico clínico quanto à vantagem de correlação com relação aos testes disponíveis no mercado (AGARWAL *et al.*, 2019; TAKESHIMA *et al.*, 2017; AGARWAL *et al.*, 2016).

Pesquisas apontam que o perfil dietoterápico está diretamente ligado à produção das EROs e da capacidade antioxidante. Assim, alta ingestão de carboidratos simples, proteínas animais e gordura saturada, bem como o baixo consumo de selênio, zinco, vitaminas C e E, e carotenóides, levam ao estresse oxidativo, impactando no processo de fertilização (DIAS *et al.*, 2019; AGARWAL; SEKHON, 2010).

A baixa ingestão de alimentos contendo selênio e zinco que apresentam propriedades antioxidantes podem alterar a síntese de suas enzimas dependentes. O zinco é precursor da enzima antioxidante superóxido dismutase (SOD), nas isoformas SOD-1, SOD-2 e SOD-3 presentes na próstata. Sua deficiência causa a disfunção das mitocôndrias do espermatozoide, levando a um quadro de oligoastenozoospermia (FRACZEK; KURPISZ, 2005). O selênio está relacionado com a fertilidade e a selenoenzima, glutathione peroxidase 4 (GPx4), presente nos testículos é vital para a espermatogênese, portanto sua baixa concentração sugere alterações na fertilidade masculina (SCHNEIDER *et al.*, 2009). Outra enzima antioxidante é a catalase (CAT) presente nas células de *Leydig* e espermatogônias que protege o espermatozoide contra os efeitos prejudiciais do estresse oxidativo (TÜRK *et al.*, 2014; NENICU *et al.*, 2007).

Pesquisa realizada por Agarwal et al. (2021b) demonstrou que 62,6% dos 1327 especialistas em reprodução assistida prescrevem suplementação antioxidante devido às condições clínicas e 68% em virtude dos fatores ambientais e estilo de vida. Os testes solicitados para avaliação do estresse oxidativo nesses pacientes revelaram que 55,8% dos médicos prescrevem para avaliar o estresse oxidativo em virtude da oligozoospermia, astenozoospermia e teratozoospermia isolada.

Outros estudos relacionaram a astenozoospermia com a disfunção mitocondrial em virtude do impacto na geração de energia e fisiologia mitocondrial. Em homens azoospermicos e com astenoteratozoospermia, esses fatores induziram apoptose espermática (KUMAR;

SANGEETHA, 2009). Portanto, a infertilidade masculina pela fragmentação do DNA foi encontrada nos estudos de Erenpreiss et al. (2008), mas também em homens com laudos seminais normais e infertilidade sem causa aparente.

Para isso, uma anamnese detalhada por meio da história clínica, exame físico, avaliação endócrina, ultrassonografia escrotal e análise seminal são necessários nessa investigação. Exames mais específicos podem ser solicitados a fim de complementar esse diagnóstico, tais como, a análise da urina pós-ejaculatória, biópsia testicular, ressonância magnética, testes de fragmentação do DNA, testes genéticos de microdeleção do cromossomo Y, cariótipo, dentre outros, mas vão depender da análise seminal prévia e do comprometimento da infertilidade (AGARWAL *et al.*, 2021b; KATZ *et al.*, 2017).

Somam-se a isso, fatores congênitos, genéticos e imunológicos, anormalidades urogenitais, infecções do trato urogenital, varicocele, disfunção sexual, alterações endócrinas, uso de medicamentos e doenças crônicas não transmissíveis, tais como obesidade, diabetes *mellitus*, hipertensão e doenças cardiovasculares. Esta última caracterizada pela gordura acumulada considerada um marcador de adiposidade central com impacto negativo na fertilidade masculina (BIAN *et al.*, 2022). Outros fatores ambientais, como tabagismo, etilismo, exposição à temperatura elevadas, de irradiação, toxinas e os idiopáticos que representam cerca de 30 a 50% dos casos (FAINBERG; KASHANIAN, 2019; LOTTI; MAGGI, 2018; JUNGWIRTH *et al.*, 2012).

1.4 Fisiopatologia da Infertilidade Masculina

A infertilidade masculina pode ser classificada por causas pré-testiculares que estão relacionadas com a produção e deficiência de hormônios (hipogonadismo hipogonadotrófico, disfunção erétil, ejaculação retrógrada e anormalidades genéticas), causas testiculares devido aos fatores genéticos, inflamatórios, infecciosos e má formações dos órgãos (tumores,

criptorquidia, varicoceles) e pós-testiculares que se relacionam com a função e transporte dos espermatozoides (lesões, doenças inflamatórias, ejaculação precoce e pós-vasectomia) (LESLIE; SOON-SUTTON; KHAN, 2023).

Dentre as anormalidades urogenitais masculinas mais comuns que levam à infertilidade, destacam-se a hipospádia associada aos fatores hormonais e genéticos e a criptorquidia uni ou bilateral que podem levar ao aparecimento do câncer testicular. São chamadas de síndrome de disgenesia testicular, com má formação congênita que impacta diretamente na fertilidade do homem pela redução da espermatogênese, concentração, motilidade e morfologia dos espermatozoides (VAN DER HORST; DE WALL, 2017; THORUP *et al.*, 2010).

Na investigação das causas masculinas de infertilidade, os testes imunológicos são complexos e dependem da avaliação do médico especialista. Isso permite a elucidação dos mecanismos imunopatogênicos pré e pós-testiculares. Dentre eles, podemos destacar os anticorpos antiespermatozoides, anticorpos anticardiolipina IgG e IgM, anticorpos antifosfolípidos IgG e IgM, β 2- glicoproteína, anticoagulante lúpico, tempo de tromboplastina parcial ativado (TTPA), plaquetas e teste pós-coital (SILVA; UTIYAMA, 2005).

As infecções do trato urinário são consideradas uma das maiores causas de infertilidade masculina (6 a 10%), pois levam a quadros inflamatórios, como prostatites, uretrites, orquites, epididimites, alterando a espermatogênese, bem como os parâmetros seminais com obstrução de ductos seminíferos e deficiência de testosterona. Isso acarreta alterações dos parâmetros seminais com diagnóstico de azoospermia, oligozoospermia e/ou teratozoospermia, por exemplo. Dos patógenos mais comuns, destacam-se a *Chlamydia trachomatis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus saprophyticus* e *Neisseria gonorrhoeae* (SCHUPPE *et al.*, 2017).

Vale a pena reforçar que em 2002, pesquisas demonstraram uma infecção pelo vírus SARS-CoV que resultou em danos na qualidade de sêmen em seis pacientes com orquite por meio de autópsia testicular. Após o decreto da pandemia em março/2020 pelo vírus SARS-COV-2, estudos observaram que os pacientes infectados apresentaram baixos níveis de testosterona e altos níveis de luteinizante (LH) e folículo-estimulante (FSH), no entanto esses mecanismos inflamatórios e alterações hormonais que levam ao estresse oxidativo precisam de maior detalhamento, tendo em vista o maior risco de distúrbios sexuais e infertilidade masculina em virtude do cenário mundial de declínio. Sabe-se que os testículos e cérebro são alvos do vírus SARS-COV-2 e alteram o eixo hipofisário-hipotalâmico-gonadal, levando a um quadro de hipogonadismo pela inflamação das células testiculares (ductos seminíferos, células espermatogônias, células de *Leydig* e de *Sertoli*). Esse mecanismo ocorre pela maior expressão de RNAm da enzima conversora de angiotensina 2 (ECA2) que é clivada pela protease transmembrana de serina 2 (TMPRSS2), possibilitando a entrada do vírus na célula. (ABOBAKER; RABA, 2021; DUTTA; SENGUPTA, 2021; SELVARAJ *et al.*, 2021; ZADEH; ARAB, 2021).

A varicocele é considerada uma patologia de natureza multifatorial que leva a infertilidade masculina de homens com diagnóstico de infertilidade primária e secundária. É caracterizada pelo alargamento do plexo pampiniforme que são veias testiculares que ajudam na troca de calor sanguíneo a fim de manter a temperatura testicular na porção do saco escrotal (AGARWAL *et al.*, 2012). Dentre as principais suposições sobre a origem da varicocele, destacam-se: 1) o aumento da pressão hidrostática do plexo pampiniforme pela inserção em ângulo reto formando um ângulo de 90° da veia testicular esquerda na veia renal esquerda, 2) defeitos congênitos nas válvulas e veias espermáticas, pelo refluxo da veia espermática interna, levando a uma dilatação anormal do plexo pampiniforme com alteração no sistema de troca de calor e 3) compressão da veia renal esquerda entre a artéria mesentérica superior e aorta

abdominal, impedindo o fluxo sanguíneo da veia testicular esquerda, aumentando a pressão hidrostática do plexo pampiniforme (Efeito Quebra-nozes). Por esse motivo, as varicoceles do lado esquerdo são as mais comuns (90% dos casos). Esse mecanismo se dá pela insuficiência ou ausência das válvulas venosas devido a maior pressão hidrostática da artéria mesentérica superior esquerda quando cruza a veia renal esquerda (ARYA; BALASINOR; SINGH, 2022; GAT *et al.*, 2005).

Estudos recentes têm mostrado que aproximadamente 3% dos homens com varicocele são sintomáticos e 15% deles, não apresentam sintomas aparentes, mas com infertilidade primária (35 a 44%) e secundária (45 a 81%). É importante ressaltar que a varicocele nem sempre causa infertilidade, mas pode prejudicar a espermatogênese devido ao aumento da temperatura testicular, promovendo hipóxia e estresse oxidativo pelo fluxo retrógrado de sangue (KANG *et al.*, 2022; JENSEN *et al.*, 2017; CHO, ESTEVES, AGARWAL *et al.*, 2016).

Segundo a *European Academy of Andrology* (EAA), 37% dos homens com varicocele possuem parâmetros seminais normais e podem gerar filhos (LOTTI *et al.*, 2020). De acordo com a OMS (1992), pesquisa realizada em 34 centros de reprodução humana demonstrou que 25,4% dos homens com diagnóstico de varicocele e 11,7% com parâmetros seminais normais conseguiram engravidar suas parceiras (PASTUSZAK; WANG, 2015).

Ainda é inconclusivo a patogênese da varicocele, mas acredita-se que o estresse oxidativo colabora com o aumento da pressão venosa pela presença das EROs, prejudicando as células germinativas, e consequentemente a espermatogênese. Soma-se a isso a ineficácia do sistema antioxidante, onde a membrana fosfolipoproteica sofre ataque das EROs, alterando os parâmetros seminais (concentração, morfologia e/ou motilidade). Outros possíveis mecanismos que induzem ao estresse oxidativo são a hipertermia escrotal, isquemia e hipóxia, alterações das

células de *Leydig*, deficiência da coenzima Q10, refluxo de metabólicos tóxicos renais e adrenais (RITCHIE; KO, 2021; JENSEN *et al.*, 2017; AGARWAL *et al.*, 2015b).

O eixo hipofisário-hipotalâmico-gonadal é foco nas investigações das causas endócrinas. O hipogonadismo hipo e hipergonadotrófico, hiperprolactinemia levam a alterações dos níveis séricos de testosterona, comprometendo as funções normais de reprodução. Exames bioquímicos devem ser solicitados, tais como testosterona, estradiol, hormônio folículo estimulante (FSH), hormônio luteinizante (LH), prolactina e hormônios tireoidianos a fim de rastrear alguma relação com a infertilidade (MACHADO, 2013). Das causas genéticas, podemos destacar a síndrome de *Klinefelter* (47, XXY e suas variantes), masculino XXY, criptorquidismo, anorquia congênita (ausência testicular), Síndrome *Naonan*, distrofia muscular miotônica e anemia falciforme (MAEGAWA; CENTA, 2000).

O estilo de vida (etilismo, tabagismo e nutrição) e fatores ambientais (radiação, poluição e estresse ao calor) surgem como grandes vilões para a saúde masculina, pois aumentam o estresse oxidativo e prejuízos seminais (RIBAS-MAYNOU; YESTE, 2020; TEIXEIRA *et al.*, 2018). O uso abusivo de álcool pode ter um efeito deletério na função dos espermatozoides com prejuízo na função das células de *Leydig* e *Sertoli* e redução na espermatogênese pelas alterações na regulação dos hormônios do eixo hipotálamo-hipofisário-gonadal (JENSEN *et al.*, 2014). O tabagismo é um fator de risco crítico na fertilidade masculina, pois aumenta os níveis das EROs e leucocitospermia, expondo o espermatozoide ao estresse oxidativo e surgimento de aneuploidias, fragmentação do DNA, apoptose celular, redução da espermatogênese, maturação e função espermática (DURAIRAJANAYAGAM, 2019).

Dentre as doenças crônicas não transmissíveis de maior repercussão na fertilidade masculina, a obesidade destaca-se como um grande problema de saúde pública mundial, pois repercute no aparecimento de outras patologias, como diabetes *mellitus*, doenças cardiovasculares, transtornos alimentares, síndrome metabólica e outras complicações. Esse

aumento do índice de massa corporal (IMC) associada à circunferência da cintura (CC) leva a alterações hormonais, como o aumento do estradiol, redução da testosterona, concentração de espermatozoides, função e composição do sêmen, inflamação e o estresse oxidativo, reduzindo a fertilidade (KATIB, 2015; ALSAIKHAN *et al.*, 2016; LEISEGANG *et al.*, 2021). No Brasil, um estudo realizado por Mancini et al. (2015), demonstrou que o sobrepeso e obesidade têm maior prevalência em homens (54,7%) do que em mulheres (47,4%).

A obesidade pode aumentar a taxa de fragmentação do DNA do espermatozoide, resistência à insulina, redução da globulina ligadora dos hormônios sexuais e aumento dos níveis de estradiol, redução da leptina e síntese de testosterona total e livre, bem como estresse oxidativo e estado inflamatório (BARBAGALLO *et al.*, 2022). Pesquisa realizada em Fortaleza-Ceará mostrou uma correlação linear positiva ($p < 0,0001$) entre índice de massa corporal (IMC) e a circunferência da cintura (CC) com alterações negativas mais acentuadas nos parâmetros seminais em homens inférteis quando comparado aos férteis, relacionando infertilidade masculina com obesidade (CUNHA *et al.*, 2021).

Um estudo de coorte multicêntrico de Bieniek et al. (2016) com 4440 homens, demonstrou 3037 homens com diagnóstico de sobrepeso e obesidade apresentaram maiores taxas de azoospermia (12,7%) e oligozoospermia (31,7%) quando comparados aos 1373 homens eutróficos com azoospermia (9,8%) e oligozoospermia (24,5%). Essa pesquisa correlacionou o aumento do IMC com a redução da testosterona e aumento do estradiol, o que pode explicar essas alterações seminais, que levam a redução do volume seminal, concentração, motilidade e morfologia do espermatozoide.

1.5 Parâmetros Seminais e Fertilidade Masculina

A Organização Mundial de Saúde padronizou as análises de sêmen humano como parâmetro de avaliação global que orientam os procedimentos e interpretações sobre a

fertilidade masculina. Isso permite a utilização desses manuais em pesquisa, bem como o diagnóstico laboratorial em clínicas especializadas. Vale salientar que essas diretrizes foram recentemente atualizadas possibilitando uma melhor avaliação do sêmen e efeito comparativo dos resultados obtidos sobre a fertilidade masculina (WHO, 2021a).

O laudo seminal ou espermograma é uma análise amplamente utilizada que permite o diagnóstico e avaliação da atividade dos epidídimos, glândulas acessórias e atividade germinativa. No entanto, não revela a função espermática e algumas condições médicas, causas genéticas, distúrbios endócrinos e metabólicos, história reprodutiva e sexual, cirurgias realizadas, uso de medicamentos, uso de suplementação oral, estilo de vida e exposição a gonadotoxinas que podem alterar a interpretação dos dados e o *status* de fertilidade masculina (ZORZI *et al.*, 2022). Consiste numa avaliação macroscópica (liquefação, viscosidade, aparência, volume e pH) e microscópica (concentração, morfologia, células redondas, motilidade, aglutinação e viabilidade) do sêmen (WHO 2021a).

A análise macroscópica do sêmen é realizada pela avaliação da cor, viscosidade, aparência, volume e pH. Finalizada essa etapa, começa a avaliação microscópica que analisa a presença de agregação, aglutinação, presença de células ou *debris*, motilidade espermática, vitalidade, número dos espermatozoides, morfologia e presença de leucócitos. A Tabela 1, a seguir, apresenta os valores de referência dos parâmetros de avaliação para o exame do sêmen humano de acordo com a recomendação da Organização Mundial de Saúde (WHO, 2021a).

Depois de liquefeito, o sêmen deve ser mantido a temperatura de 37°C por até 30 minutos e, após este período, 10 µL devem ser retirados e transferidos para câmara de contagem tipo *Makler*® ou *Microcell*® para cálculo da concentração e motilidade espermática, a saber: grau A – motilidade linear rápida e progressiva; B – motilidade linear lenta e progressiva; C – motilidade não progressiva e D – imóvel. Para a contagem espermática é utilizada a câmara de *Neubauer* onde se faz o cálculo do número de espermatozoides em milhões por mililitro ($\times 10^6$

por mL) de sêmen. Para obter o total de espermatozoide no ejaculado multiplica-se o volume total da amostra pelo valor dessa concentração dos espermatozoides (FEIJÓ *et al.*, 2012; WHO, 2021a).

Para a realização da análise morfológica dos espermatozoides é utilizada a coloração eosina-nigrosina a 5% em objetiva de imersão de luz convencional. Pelo critério estrito descrito por Kruger et al. (1986), os espermatozoides considerados morfolologicamente normais são aqueles com cabeça oval e lisa medindo entre 5 a 6 μm de comprimento, 2,5 a 3,5 μm de diâmetro, 40 a 70% de acrossoma, peça intermediária sem defeitos com menos de 1 μm de largura e 1,5 μm de comprimento e cauda fina e uniforme com 45 μm de comprimento. Para cada 100 espermatozoides avaliados, pelo menos, quatro devem ser normais, o que representa índice igual ou superior a 4%. Quando esse índice de morfologia apresentar um valor menor do que esse, o paciente deve ser encaminhado para avaliação do médico especialista em reprodução assistida.

Tabela 1. Parâmetros de avaliação para o exame do sêmen humano de acordo com a recomendação da Organização Mundial de Saúde (2021a).

Parâmetros	Recomendação
Abstinência	2 a 7 dias
Ph	6 a 10
Volume (mL)	$\geq 1,4$
Contagem espermatozoide (milhões/mL)	$\geq 1,6$
Espermatozoide no ejaculado (milhões/mL)	$> 22,5$
Motilidade progressiva (A^1+B^2)	$\geq 30\%$
Motilidade total ($A^1+B^2+C^3$)	$\geq 42\%$
% de formas vivas (eosina 0,5%)	$> 58\%$
Aglutinação	Ausente
Agregados	Ausente
Morfologia estrito de Kruger (% normais)	$\geq 4\%$
Leucócitos ($10^6/\text{mL}$)	$< 1,0$
Vitalidade (vivos) – Teste hiposmótico – 2 horas a 37°C	< 40
Zinco (μmol)	$> 2,4$
Frutose (μmol)	$\geq 3,0$
α -Glucosidase (mU) [>20]	> 20

A¹:motilidade linear rápida e progressiva; B²:motilidade linear lenta ou progressiva; C³:motilidade não progressiva

Neste sentido, o diagnóstico laboratorial por meio da análise do espermograma pode ser utilizado para avaliar a fertilidade masculina e sinalizar os diferentes tipos de infertilidade relacionados à concentração, motilidade e morfologia dos espermatozoides (FEIJÓ *et al.*, 2012). A Tabela 2 abaixo apresenta o diagnóstico laboratorial (concentração, motilidade e morfologia) de acordo com a recomendação da Organização Mundial de Saúde (WHO, 2021a). Homens são diagnosticados e padrões de fertilidade são definidos de acordo com os parâmetros do sêmen. Indivíduos normozoospermicos possuem concentração, motilidade e morfologia espermática dentro dos valores recomendados. Os oligozoospermicos apresentam baixa concentração de espermatozoides e os astenozoospermicos possuem alterações na motilidade (motilidade progressiva, motilidade não progressiva e imóveis). Alterações na forma e no aspecto dos espermatozoides limítrofes são características de homens com teratozoospermia (WHO, 2021a). Além disso, o médico especialista em fertilidade utiliza uma abordagem holística, considerando a história clínica do paciente, exames de imagem e bioquímicos, e outros fatores relevantes para obter uma compreensão completa da situação (WHO, 2021a).

Tabela 2. Diagnóstico laboratorial (concentração, motilidade e morfologia) de acordo com a recomendação da Organização Mundial de Saúde (2021a).

Diagnóstico laboratorial	Recomendação
Concentração (10⁶/mL)	
Normozoospermia	$\geq 22,5$
Oligozoospermia	$< 22,5$
Azoospermia	Ausência
Motilidade (%)	
Astenozoospermia (móveis progressivos: A ¹ +B ²)	≤ 30
Astenozoospermia (móveis totais: A ¹ +B ² +C ³)	≤ 42
Morfologia estrito de Kruger (%)	
Normais	≥ 4
Teratozoospermia (formas anormais)	

A¹:motilidade linear rápida e progressiva; B²:motilidade linear lenta ou progressiva; C³:motilidade não progressiva

1.6 Plasma Seminal

O plasma seminal é constituído de fluidos oriundos dos testículos, do epidídimo e glândulas sexuais acessórias, como as vesículas seminais (65%), próstata (25%) e glândulas bulbouretrais (*Cowper*) e as glândulas periuretrais (*Littre*) (5%). Desempenha múltiplas funções essenciais para a fertilidade masculina e fertilização bem-sucedida, incluindo transporte dos espermatozoides, integridade acrossômica, regulação da capacitação e concentrações intracelulares dos íons cálcio, interação com os tecidos femininos e modulação da resposta imunológica feminina para evitar a eliminação dos espermatozoides, variando de espécie para espécie (TURUNEN *et al.*, 2022; KEKÄLÄINEN *et al.*, 2020; SAMANTA *et al.*, 2018; DRUART *et al.*, 2013; RODRIGUEZ-MARTINEZ *et al.*, 2011).

Esse fluido seminal complexo contém mais proteínas e peptídeos (35 a 55 mg/mL) do que o plasma sanguíneo, bem como nutrientes, íons e sais orgânicos, hormônios específicos, colesterol, DNA e RNA (protegidos nas vesículas extracelulares), prostaglandinas e açúcares responsáveis pela proteção, efeito tampão e nutrição, permitindo o sucesso ou não da fertilização (RODRIGUEZ-MARTINEZ *et al.*, 2021; DRUART *et al.*, 2013; MILARDI *et al.*, 2012).

As principais proteínas presentes no plasma seminal pertencem a três grupos, agrupadas em três categorias: proteínas que transportam módulos de fibronectina tipo II (Fn2), espermadesinas e proteínas secretoras ricas em cisteína. Dependendo da espécie, podem apresentar diferenças no tipo e no local de síntese dessas proteínas (DE AZEVEDO VIANA *et al.*, 2021).

Durante a ejaculação, ocorre a adição das secreções das vesículas seminais (70%) responsáveis pela coagulação (semenogelinas I e II) aos espermatozoides oriundos do epidídimo. Em seguida, as secreções prostáticas (20%) são incorporadas ao fluido seminal, como antígeno prostático específico, fosfatase ácida prostática, proteína rica em cisteína-94

(PSP-94) ou β micro-seminoproteína com função de liquefazer o sêmen (SAHLÉN *et al.*, 2010). Tanto as vesículas seminais quanto a próstata contribuem com os açúcares para a nutrição do espermatozoide. Além disso, as células epiteliais da próstata secretam vesículas chamadas de prostassomas, contendo lipídios, proteínas, DNA e RNA para estimular a motilidade espermática, regular o tempo de capacitação e proteger contra a resposta imune do trato feminino (DA SILVA *et al.*, 2016; AALBERTS; STOUT; STOORVOGEL, 2013). As glândulas bulbouretrais participam com a secreção de várias mucoproteínas, numa proporção menor, mas importante na interação celular e imune (JODAR *et al.*, 2017).

Portanto, as interações do espermatozoide com as proteínas do plasma seminal são complexas e sofrem interferências das condições fisiológicas e patológicas. Isso deve-se a relação com os diferentes sistemas antioxidantes enzimáticos e não-enzimáticos do plasma seminal que protegem os espermatozoides contra o estresse oxidativo e os danos ao DNA (DRUART; GRAAF, 2018; VIREQUE *et al.*, 2016). Na Tabela 3, apresentamos uma visão geral das principais proteínas e substratos das glândulas sexuais acessórias, mencionados acima, bem como as suas características e funções (SEELEY *et al.*, 2016; VIREQUE *et al.*, 2016).

Tabela 3. Visão geral das principais proteínas, características, substratos e funções das glândulas sexuais acessórias.

Glândulas	Caraterísticas	Substratos	Proteínas	Função
acessórias				
Vesícula seminal	Líquido viscoso e alcalino	Frutose (energia)	Semenogelina	Gelificação, inibição da motilidade espermática e atividade antibacteriana
		prostaglandinas (contrações no músculo liso)	Lactoferrina	
			Fibronectina	
			Inibidor de proteína C	Antioxidante

Glândulas acessórias	Caraterísticas	Substratos	Proteínas	Função
Próstata	Líquido aquoso e ligeiramente ácido	Ácido cítrico, zinco, cálcio, GPx4	Antígeno prostático específico (PSA)	Liquefação do coágulo pela hidrólise das semenogelinas
			Fosfatase ácida prostática e proteína secretora rica em cisteína	Fator de crescimento e fertilização
Glândulas Bulbouretrais	Produção de muco	Mucoproteínas	Mucina da uretra e vaginal	Neutralizar a acidez

Fonte: SEELEY *et al.*, 2016; VIREQUE *et al.*, 2016

Com base nos estudos de Gilany *et al.* (2015) foram descritas 4.188 proteínas diferentes no plasma seminal. Na busca por potenciais biomarcadores de fertilidade masculina, as tecnologias proteômicas permitem identificar proteínas para diagnóstico e tratamento.

Ao identificar as proteínas e biomarcadores presentes no plasma seminal é possível obter *insights* sobre os processos biológicos envolvidos na reprodução humana. A análise proteômica do plasma seminal pode esclarecer os mecanismos moleculares e genéticos relacionados à reprodução humana. Essas diferenças envolvem alterações nas concentrações de substâncias bioquímicas, como enzimas, hormônios, proteínas e outros componentes presentes no plasma seminal, afetando os parâmetros seminais, como a concentração, motilidade e morfologia (VIREQUE *et al.*, 2016; KOVAC *et al.*, 2013; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, *et al.*, 2011). Baseado nessas informações, é possível avaliar a fertilidade masculina por meio da análise proteômica do plasma seminal em virtude da presença dessas proteínas com funções e atividades específicas com o *status* de fertilidade (DRUART *et al.*, 2013). Na Tabela 4, apresentamos uma lista e funções de algumas proteínas presentes no

plasma seminal humano com papéis importantes nos mecanismos moleculares e genéticos (KOVAC *et al.* 2013, MOURA *et al.*, 2010; EL-DAKHLIY *et al.*, 2007; MOURA *et al.*, 2006 a,b).

Tabela 4. Lista e funções de algumas proteínas presentes no plasma seminal humano

Proteínas no plasma seminal humano	Funções
Albumina seminal	Protetor da membrana espermática
Beta-2-microglobulina	Ação enzimática do fator de crescimento
Clusterinas	Redução da citotoxicidade
Dipeptidase inespecífica citosólica	Ação enzimática do fator de crescimento
Espermadesinas	Capacitação espermática
Fator de crescimento transformador β	Reação inflamatória
Fibronectina	Proteína de ligação à heparina
Fosfatase ácida prostática	Ação enzimática do fator de crescimento
Lactoferrina	Atividade bactericida
Laminina	Aumento da concentração de espermatozoides
Prolactina (PIP)	Capacitação e motilidade espermática
Proteína antimicrobiana catiônica humana (hCAP18)	Imunidade inata e proteção contra infecção
Proteína de ligação à galectina	Ação enzimática do fator de crescimento
Proteína de ligação à heparina (HPS)	Capacitação espermática
Antígeno prostático específico (PSA)	Atividade proteolítica
Semenogelinas I e II	Atividade enzimática catalítica
Spindlin 1	Espermatogênese e motilidade espermática
Subunidade alfa do proteassoma tipo 3	Ação enzimática do fator de crescimento

Fonte: KOVAC *et al.* 2013, MOURA *et al.*, 2010; EL-DAKHLIY *et al.*, 2007; MOURA *et al.*, 2006 a,b

Das proteínas mencionadas acima, destacamos as espermadesinas que são proteínas multifuncionais encontradas no plasma seminal humano que induzem uma resposta pró-inflamatória do endométrio, regulando e prevenindo possíveis infecções e embriões livres de células. Sua presença confere melhoria na viabilidade dos espermatozoides, aumentando a capacidade de fertilização. A espermadesina detectada em humanos foi a *acidic seminal fluid protein* (aSFP) que possui fraca ligação com a membrana do espermatozoide e com a zona pelúcida, mas em altas concentrações possui efeito contra o estresse oxidativo, além de

estimular a produção de progesterona pelo endométrio e células ovarianas em bovinos (BARRANCO *et al.*, 2015). A aSFP possui sequência de aminoácidos semelhantes à espermedesina Z 13 (MOURA *et al.*, 2011; MOURA *et al.*, 2010; MOURA *et al.*, 2006a). As lectinas do tipo 1 são espermedesinas animais presentes no plasma seminal de vários mamíferos presentes no ejaculado e envolvidas na capacitação espermática, aumentando a interação espermatozoide-oócito (SHARON *et al.*, 2004).

Além dessas, citamos o fator de crescimento transformador β secretado pela vesícula seminal e glândulas prostáticas que interagem com células epiteliais no colo do útero e no útero, ativando a síntese de citocinas e induzindo alterações celulares e moleculares na cascata inflamatória (ROBERTSON *et al.*, 2005).

1.7 Espermatozoide

Os espermatozoides são células altamente polarizadas e imaturas que possuem uma membrana especializada que responde de forma rápida às mudanças no ambiente e regulação do equilíbrio iônico (PUGA MOLINA *et al.*, 2018). Essa membrana espermática é composta por ácidos graxos poliinsaturados, esteróis (colesterol), fosfatidilcolinas e esfingomielinas e tem se mostrado essencial para a motilidade espermática e capacidade de fertilização (VIREQUE *et al.*, 2016).

Durante a espermatogênese, o processo pelo qual os espermatozoides são formados a partir das células germinativas nos testículos, o sistema nervoso central desempenha um importante papel na liberação de neuropeptídeos, as kisspeptinas, que estimulam a liberação do hormônio gonadotropina (GnRH) pelo hipotálamo. O GnRH, por sua vez, interage com as células gonadotróficas da hipófise anterior, estimulando a produção de dois hormônios: o hormônio folículo estimulante (FSH) e o hormônio luteinizante (LH). Esses hormônios são essenciais e regulados pelo eixo denominado hipofisário-hipotalâmico-gonadal. Alterações

nesse eixo podem afetar negativamente a produção de espermatozoides e a fertilidade masculina (BARBAGALLO *et al.*, 2021).

O FSH e LH são glicoproteínas que agem diretamente nas gônadas, em homens, nos testículos. Entretanto, esses hormônios atuam em diferentes grupos de células gonadais. O FSH age nas células de *Sertoli*, estimulando a espermatogênese e a produção do hormônio inibina B. O LH age nas células de *Leydig*, induzindo a produção testicular de testosterona (NUNES *et al.*, 2023; LEISEGANG *et al.*, 2021; BARBAGALLO *et al.*, 2021). Na espécie humana, a espermatogênese consiste num processo cíclico, em torno de 74 dias, que envolve células germinativas (espermatogônias), espermátocitos primários e secundários e uma remodelagem das espermátides (espermiogênese) com a formação de espermatozoides maduros contidos nos túbulos seminíferos. Cada espermatozoide é formado por cabeça (2,5 a 3,5cm), peça intermediária (1,5 vezes a cabeça), parte principal e final da cauda (45µm). Na cabeça existe o acrossoma, membrana da superfície, vacúolo, capuz anterior da cabeça e capuz posterior da cabeça. Na peça intermediária, encontra-se o pescoço, corpo e as mitocôndrias. E na cauda, temos o flagelo, como aproximadamente 11 microtúbulos chamado de axonemas responsáveis pela motilidade (Figura 2) (WHO, 2021a; FLESCHE; GADELLA, 2000).

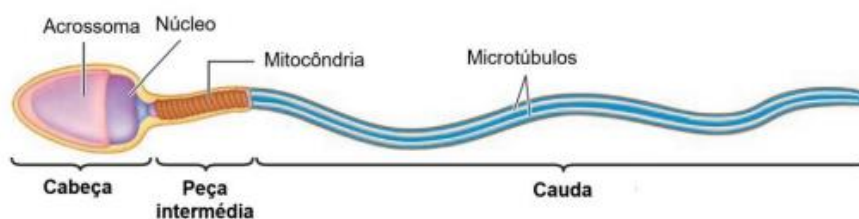


Figura 2. Representação das partes constituintes de um espermatozoide humano. Fonte: Adaptado de Sherwode (2008).

O plasma seminal oferece um ambiente ideal para a aquisição da motilidade espermática e capacidade de fertilização. No plasma seminal, encontram-se substâncias como o colesterol livre e zinco que possuem uma ação descapacitante, ajudando a prevenir a

capacitação precoce. Após a ejaculação, o sêmen forma um coágulo gelatinoso devido à ação das proteínas seminais, com as semenogelinas I e II. Esse coágulo tem função de proteger os espermatozoides contra a acidez vaginal. Durante esse período, o movimento dos espermatozoides fica temporariamente inibido. Em seguida, ocorre a liquefação do coágulo, mediada pela ação das calicreínas, em particular, a proteína chamada antígeno prostático específico. Essa liquefação permite a aquisição da motilidade pelos espermatozoides, liberando-os para nadar em direção ao óvulo (CANDENAS; CHIANESE, 2020).

No trato reprodutor masculino, as concentrações iônicas, incluindo o íon cálcio, desempenham um papel na regulação da motilidade e fusão espermática. As alterações nas concentrações iônicas, especialmente o influxo de íons sódio (Na^+), causam a despolarização da membrana espermática. Isso leva à ativação de canais iônicos, como a bomba de $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{ATPase}$, que é responsável pela manutenção dos gradientes de concentração de sódio e potássio. A regulação desses gradientes é importante para a motilidade dos espermatozoides e sua capacidade de fusão com o óvulo durante a fertilização (JIMENEZ *et al.*, 2020).

Após a ejaculação, várias transformações fisiológicas e bioquímicas acontecem para que o espermatozoide seja capaz de fertilizar. Durante a capacitação espermática ocorrem modificações citoplasmáticas para facilitar a reação acrossômica e fertilização oócito-espermatozoide (GUERRA; PETERS, 1999). À nível molecular, ocorre a perda de colesterol e modificações de outros lipídios, para aumentar a fluidez da membrana. Em seguida, o aumento do pH extracelular pela presença do bicarbonato (H_2CO_3) estimula a adenosina monofosfato cíclico (cAMP), ativando a proteína quinase A (PKA), pela via cAMP/PKA, mas também o aumento da atividade da adenilil ciclase solúvel ADCY10 (sAC) (PUGA MOLINA *et al.*, 2018). A PKA ativada induz a fosforilação de proteínas em serina e treonina que são fundamentais para o início do processo de capacitação espermática, permitindo alterações na membrana espermática para a reação acrossômica (BALBACH *et al.*, 2021). O aumento da

concentração de sAC alcaliniza o meio intracelular e hiperpolariza a membrana espermática que ativará os canais de K^+ e Ca^{2+} , para capacitação e hiperatividade da motilidade do espermatozoide (BALBACH *et al.*, 2021).

Vale salientar que as vias de sinalização desempenham um papel crucial no controle do potencial de membrana e na regulação dos processos fisiológicos e bioquímicos durante a capacitação espermática. A ativação de transportadores e canais iônicos na membrana espermática é fundamental para manter o equilíbrio iônico e o potencial de membrana adequados para o funcionamento normal dos espermatozoides. O transporte de íons como sódio, potássio e hidrogênio é essencial para a regulação da motilidade, fusão espermática importantes para a fertilização (NOWICKA-BAUER; SZYMCZAK-CENDLAK, 2021).

1.8 Proteômica e Infertilidade Masculina

Proteômica é o estudo do proteoma de uma determinada célula, tecido, organismo ou fluido biológico que são produzidos em um determinado tempo sob determinadas condições (WILKIN *et al.* 1997). A análise do proteoma é fundamental para entender como as proteínas contribuem para as características e a função biológica de um organismo (GALDOS, 2009). A proteômica se baseia em princípios bioquímicos, biofísicos e de bioinformática e utiliza técnicas avançadas, como espectrometria de massas, eletroforese bidimensional e microarranjos de proteínas para analisar as características e propriedades das proteínas. Os principais objetivos da proteômica são gerar um banco de dados a partir da identificação, caracterização e quantificação dessas proteínas, analisando as modificações pós-traducionais e interações proteína-proteína, e descoberta de biomarcadores (BARBOSA *et al.*, 2012).

A análise proteômica tem sido aplicada para investigar alterações proteicas em condições específicas relacionadas à infertilidade masculina, como varicocele, obstrução dos ductos deferentes, disfunção hormonal e estresse oxidativo. Esses estudos podem revelar

alterações quantitativas e qualitativas dessas proteínas presentes no plasma seminal de homens afetados pela infertilidade (KRZASTEK; SMITH; KOVAC, 2020).

Segundo o trabalho de De Mateo et al. (2007), a identificação do proteoma do plasma seminal, além de identificar as proteínas expressas, permite quantificá-las e correlacioná-las com as funções celulares específicas, facilitando o detalhamento sobre a espermatogênese e fertilização.

A identificação de biomarcadores no plasma seminal pode ser realizada por meio da análise proteômica. Isso possibilita uma melhor investigação da fertilidade masculina através da detecção de genes, proteínas e metabólitos exclusivos nos parâmetros seminais de homens férteis e inférteis, mostrando alterações na concentração, motilidade e morfologia dos espermatozoides e índices de fertilidade (KOVAC; PASTUSZAK; LAMB, 2013).

Estudo de Agharezaee et al. (2018) reforçou que a proteômica do plasma seminal é uma tecnologia econômica que possibilita a comparação do proteoma de pacientes férteis e com teratozoospermia na elucidação de biomarcadores para fertilidade.

Por meio da análise proteômica, o estudo de Sharma et al. (2013) com 52 participantes (20 férteis e 32 inférteis) examinou a distribuição e alteração das proteínas expressas nos espermatozoides no estresse oxidativo, como a metaloendopeptidase de membrana, enquanto a fibronectina 1 e o fator de inibição da migração de macrófagos não tiveram expressão no plasma seminal na presença das EROs.

A pesquisa de Intasqui et al. (2013) avaliou proteínas expressas nos espermatozoides de 89 homens normozoospermicos com baixa fragmentação do DNA. Esses resultados mostraram a presença de proteínas expressas relacionadas ao estresse oxidativo, tais como a fosfoglicerato quinase 2 e clusterina. Na presença de fragmentação de DNA, as proteínas encontradas foram as proteínas transportadoras de glicose facilitado, proteína de fibra densa externa, proteína de canal seletivo de ânion dependente de voltagem, proteína de canal

seletiva de ânions dependente de voltagem, proteína 2 de ligação à zona pelúcida e a progastricsina.

De acordo com a pesquisa de Camargo et al. (2013), o perfil proteômico no estudo da varicocele vem ajudando na distinção entre a varicocele uni e bilateral. Esse estudo mostrou o mecanismo das alterações celulares pela expressão das proteínas, elucidando as vias moleculares no plasma seminal e funções de modulação, capacitação e reação acrossômica dos espermatozoides observado na pesquisa de Zylbersztejn et al. (2013).

Hashemitabar et al. (2014) analisou o perfil protéico utilizando espectrometria de massas (MALDI-TOF-TOF) e identificou 14 proteínas únicas no plasma seminal de 35 homens férteis e 33 com astenozoospermia. No grupo fértil, onze proteínas foram as mais expressas, dentre elas, proteínas fibra densa externa 2 (ODF2), tubulina beta 2B (TUBB2B), subunidade 6B da citocromo c oxidase (COX6B), glutathione S-transferase Mu 3 (GSTMu3), fosfolípido hidroperóxido glutathione peroxidase (PHGPx), gliceraldeído3-fosfato desidrogenase, testículo específico (GAPD-S), proteína de canal seletivo de ânion dependente de voltagem 2 (VDAC2), proteína 2 de 70 kDa relacionada ao choque térmico (HSPA2), mitocondrial (HSPA9) e proteína do sêmen associado ao núcleo do cromossomo X B (SPANXB). Na classificação funcional, a maioria se enquadrava em cinco grupos: energia e metabolismo (COX6B, GAPDS, PHGPx), movimento e organização estrutural (ODF2), resposta ao estresse e *turn over* (HSPA2, HSPA9), sinalização e transporte (VDAC2) e atividade antioxidante (GSTMu3). No grupo com astenozoospermia, as três mais expressas foram a clusterina (CLU), queratina citoesqueleto 1 do tipo II (KRT1) e isoaspartil peptidase/L-asparaginase (ASRGL1). Na classificação funcional, todas estavam relacionadas ao movimento e organização estrutural.

Estudo de Agarwal et al. (2015b) com 33 homens com varicocele identificou proteínas testiculares expressas na presença das EROs e apoptose espermática. As mais expressas foram a diidrolipoila desidrogenase, precursora mitocondrial (DLD), glutathione S

transferase Mu 3 (GSTM3), proteína-glutamina gama glutamil transferase 4 (TGM4), proteína 2 de fibra densa externa (ODF2), receptor acoplado à proteína G 64 (GPR64), subunidade beta do proteassoma (PSM8), Histona H1 (HIST1), Histona 2BA (H2BA) e desglucase associada ao parkinsonismo 7 (PARK7). As menos expressas foram a proteína regulada pela fosforilação da tirosina (CABYR), proteína âncora A-quinase 3 (AKAP), pré-proteína Apolipoproteína A-I (APOPA1), pré-proteína semenogelina-1 (SEMG1), precursor de acrosina (ACR), proteína de superfície do esperma Sp17 (SPA17), homólogo de cabeça do raio 1 radial (RSPH1), radial isoforma 1 do homólogo da proteína 9 da cabeça do raio (RSPH9) e proteína axonema da cadeia pesada de dineína 17 (DNAH17).

Outro estudo observou a expressão de proteínas no plasma seminal de nove homens inférteis utilizando espectrometria de massas (SELDI-TOF-MS). Nesses indivíduos, houve a expressão aumentada da ubiquitina (E2) envolvida na transferência de ubiquitina para a superfície dos espermatozoides defeituosos durante a passagem do epidídimo e cistatina que são inibidores das proteinases de cisteína, como as catepsinas de mamíferos B, H, L e S presentes em processos inflamatórios (Cadavid *et al.*, 2014)

O estudo de Agarwal *et al.* (2016) realizado em 17 pacientes com varicocele identificou seis proteínas diferencialmente expressas (DEPs) relacionadas ao estresse oxidativo com efeitos deletérios ao espermatozoide, redução da motilidade e morfologia. Foram elas: calmegina (controle do cálcio celular), tripeptidil peptidase II (atividade proteolítica), dineína cadeia intermediária 2 (movimento ciliar do espermatozoide), proteína de choque térmico 70 kDa (estresse térmico), antígeno endossômico precoce (tráfego intracelular de vesículas endossômicas) e inibidor plasmático de serina protease (resposta inflamatória).

A varicocele está associada ao aumento do estresse oxidativo que pode causar danos ao DNA, lipídios e proteínas no sistema reprodutivo masculino. Um dos principais efeitos é a diminuição das proteínas mitocondriais envolvidas no metabolismo energético. Por meio da

análise proteômica no plasma seminal, algumas proteínas, como a ATPase 1A4 da membrana plasmática, proteínas de choque térmico da família 2 (HSPA2), proteína auto-antogênica 17 (SPA17) e apolipoproteína A1 (APOA1) foram associadas às alterações na função e estrutura mitocondrial do espermatozoide em homens com varicocele. Outras proteínas foram relacionadas com a cadeia transportadora de elétrons, a NADH-ubiquinona oxidoreductase (NDUFS1), aconitase 2 (ACO2), alfa-cetoglutarato desidrogenase (OGDH), subunidade 2 do complexo citocromo B-C1 (UQCRC2) e isocitrato desidrogenase (IDH3B), que levam à hipóxia e estresse oxidativo (PANNER SELVAN; AGARWAL, 2020). A Tabela 4 apresenta alguns estudos sobre a regulação das proteínas no plasma seminal humano de acordo com o diagnóstico laboratorial (GIACOMINI *et al.*, 2015; AMARAL *et al.*, 2014; DRABOVICH *et al.*, 2014; SHARMA *et al.*, 2013; STARITA-GERIBALDI *et al.*, 2003; STARITA-GERIBALDI *et al.*, 2001).

Tabela 5. Regulação das proteínas no plasma seminal humano de acordo com o diagnóstico laboratorial

Autor (es)	Diagnóstico Laboratorial	Regulação das proteínas			
		Baixa	Alta	Ausência	Desregulação
Starita-Geribaldi <i>et al.</i> (2001)	AZ ^a			ACPP ¹ , CLU ² , KLK3 ³ , AZGP1 ⁴ , PAEP ⁵	
Sharma <i>et al.</i> (2013)	OAZ ^b		KLK3 ³ , SEM1 ⁶		
Amaral <i>et al.</i> (2014)	ATZ ^c	CST3 ⁷			PTPN14 ⁸

Drabovich <i>al.</i> (2014)	<i>et</i> AZ ^a	TEX11 ⁹
Drabovich <i>al.</i> (2014)	<i>et</i> AZ ^a Vasectomizado	ECM1 ¹⁰
Giacomini <i>al.</i> , (2015)	<i>et</i> OATZ ^d	NPC2 ¹¹ , LGALS3 ¹² , LCN1 ¹³ , PIP ¹⁴

AZ^a: azoospermia; OAZ^b: oligoastenozoospermia; ATZ^c: astenozoospermia; OATZ^d: oligoastenoteratozoospermia; ACP¹: fosfatase ácida prostática; CLU²: clusterina; KLK3³: antígeno específico da próstata ou PSA; AZGP1⁴: zinco-alfa-2-glicoproteína; PAEP⁵: glicodelina; SEMG1⁶: semenogelina 1; CST3⁷: cistatina-C; PTPN14⁸: não receptor de tirosina-proteína fosfatase tipo 14; TEX101⁹: proteína expressa em testículo 101; ECM1¹⁰: proteína 1 da matriz extracelular; NPC2¹¹: transportador de colesterol intracelular; LGALS3¹²: proteína de ligação à galectina-3, LCN1¹³: lipocalina-1; PIP¹⁴: proteína induzida por prolactina.

1.9 Justificativa

Sabe-se que a infertilidade afeta aproximadamente de 10 a 15% dos casais em idade reprodutiva sendo considerada um problema de saúde pública mundial. Infelizmente, gera inquietação, ansiedade, estigma social, depressão e frustração ao casal diante da impossibilidade de gerar seu próprio filho (DOUROU *et al.*, 2023). No Brasil, a lei da Constituição Federal, que trata do planejamento familiar no. 9263 publicada em 12 de janeiro de 1996, assegura ao ser humano o direito de reprodução e constituir a sua família (BRASIL, 2018). Desta forma, é absolutamente importante elucidar os fatores e causas subjacentes para ajudar esses casais que não alcançam a gravidez desejada.

A obesidade é uma doença crônica não transmissível e evitável com características multifatoriais complexas (WHO, 2021b). Tem sido associada a uma série de complicações de saúde, incluindo problemas reprodutivos, adiposidade central, influenciado pelo estilo de vida, fatores emocionais, hormonais e genéticos (SOUZA *et al.*, 2020). Mudanças no estilo de vida,

incluindo hábitos alimentares inadequados, uso abusivo de álcool, tabagismo e redução da prática de atividade física aumentam a possibilidade de doenças, como obesidade e diabetes *mellitus*, gerando um impacto negativo na fertilidade (DEL GIUDICE *et al.*, 2020; DURAIRAJANAYAGAM *et al.*, 2018; KATZ *et al.*, 2017).

Homens com diagnóstico de sobrepeso e obesidade apresentam maiores taxas de azoospermia e oligozoospermia quando comparados a homens eutróficos pela redução da testosterona e aumento do estradiol, o que pode explicar as alterações seminais, como a redução do volume, concentração, motilidade e morfologia do sêmen (BIENIEK *et al.*, 2016a) e desfechos inflamatórios devido ao estresse oxidativo (LEISEGANG *et al.*, 2021). Além disso, o excesso de peso leva ao aumento da circunferência da cintura, um marcador de adiposidade central, que prejudica a qualidade seminal (BIAN *et al.*, 2022). Todos esses aspectos aumentam a busca do casal por tratamentos reprodutivos especializados em virtude da ausência da gravidez (MOHAJAN; MOHAJAN, 2023; BREBAL *et al.*, 2020; MURSHIDI *et al.*, 2020).

Considerando que os fatores masculinos representam 50% das causas de infertilidade masculina e que podem estar relacionados pelas condições médicas, como distúrbios hormonais, varicocele ou danos testiculares, estudos proteômicos são promissores para o desenvolvimento de biomarcadores de fertilidade masculina, evitando exames mais invasivos e melhor compreensão dos processos fisiopatológicos (BIENIEK; LO, 2016).

A análise proteômica do plasma seminal é uma ferramenta promissora para identificar biomarcadores que possam ajudar no diagnóstico da infertilidade masculina, ajudando a desvendar esses processos biológicos envolvidos, tais como desenvolvimento de células germinativas, espermatogênese e processos metabólicos, por exemplo (OMOLAOYE *et al.*, 2022).

Embora, muitos estudos tenham demonstrado as proteínas expressas e sua importância na avaliação do sêmen, a identificação de potenciais biomarcadores no plasma

seminal humano por meio da análise proteômica, aumentam o conhecimento sobre o conjunto de proteínas expressas que levam às alterações dos parâmetros seminais em virtude de mudanças bioquímicas e no funcionamento celular sob diferentes condições e estímulos. Essa investigação representa uma ponte de ligação entre o genótipo e fenótipo de um organismo, responsável, por exemplo, pelo diagnóstico de infertilidade masculina (KRZASTEK *et al.*, 2020).

Neste sentido, a presente tese teve dois objetivos: 1) avaliar a associação entre o índice de massa corpórea (IMC), a circunferência da cintura (CC), incluindo o estilo de vida de homens em tratamento reprodutivo e 2) identificar biomarcadores para infertilidade masculina a partir da caracterização proteômica do plasma seminal desses homens atendidos numa clínica de reprodução assistida.

2 HIPÓTESES CIENTÍFICAS

Diante do exposto, as seguintes hipóteses científicas foram formuladas:

- Existe associação entre o perfil antropométrico, socioeconômico e estilo de vida com os parâmetros seminais;
- Existe diferença entre o proteoma do plasma seminal de homens normais e varicocele com oligo e/ou asteno e/ou teratozoospermia.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivos Gerais

- Avaliar a associação entre o índice de massa corpórea (IMC), a circunferência da cintura (CC), as características socioeconômicas e o estilo de vida dos participantes atendidos numa clínica de medicina reprodutiva;
- Caracterizar o proteoma do plasma seminal dos homens atendidos com diferentes diagnósticos de fertilidade atendidos em um centro de medicina reprodutiva em Fortaleza, Ceará.

3.2 Objetivos Específicos

- Identificar o perfil socioeconômico, antropometria, clínico e o estilo de vida para a caracterização dos participantes da pesquisa;
- Avaliar os parâmetros seminais dos participantes da pesquisa;
- Classificar os participantes da pesquisa conforme diagnóstico clínico de varicocele.

4 FLUXOGRAMA DA PESQUISA

Os homens foram abordados na sala de espera da clínica de medicina reprodutiva, antes da coleta seminal, enquanto aguardavam a realização do tratamento prescrito pelo médico especialista. No momento da abordagem, um folder explicativo (APÊNDICE A) foi entregue a fim de facilitar o entendimento sobre a pesquisa. Após o aceite, os homens eram encaminhados a uma sala reservada para assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (ANEXO A) e preenchimento do formulário socioeconômico, antropométrico e bioquímico (APÊNDICE B). Esse formulário era baseado em perguntas para caracterização dos participantes, tais como: idade, naturalidade, etnia, estado civil, grau de instrução, profissão, número de filhos, estilo de vida, doenças na família, medicamentos em uso, suplementos em uso, tempo que desejavam ter filhos, se tinha realizado espermograma, se fez/fazia algum tratamento em reprodução humana e se tinham exames bioquímicos, como testosterona total, testosterona livre, hormônio folículo estimulante, hormônio luteinizante, estradiol, hemograma, prolactina e hormônio tireoidiano. Após o preenchimento do formulário, as medidas antropométricas foram realizadas, peso (kg) e circunferência da cintura (cm), e estatura (m) referida pelo participante. Depois disso, os homens retornavam à sala de espera onde eram direcionados para a sala de coleta seminal.

A Figura 3, representa o fluxograma com uma visão geral da pesquisa. Dos 131 homens abordados, 98 homens foram destinados para a realização da pesquisa 1 e 19 foram selecionados para a pesquisa 2. Dos quatorze participantes excluídos do estudo, cinco não conseguiram realizar a coleta seminal com sucesso e nove pela falha ocorrida na punção folicular da esposa durante o procedimento de injeção intracitoplasmática de espermatozoide.

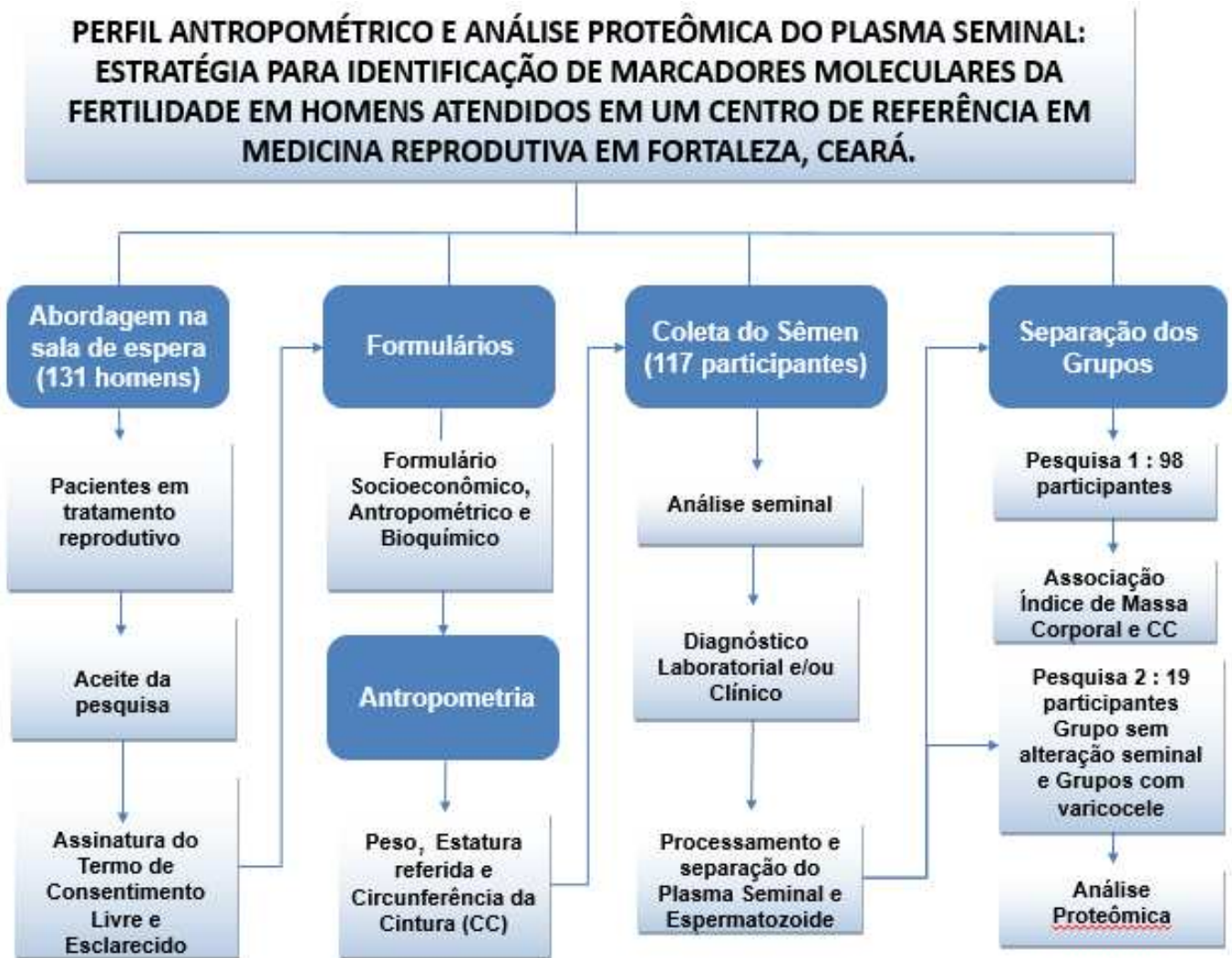


Figura 3. Fluxograma da pesquisa

5 CAPÍTULO I

**Associations among body mass index, waist circumference, lifestyle, health
and semen quality of men treated at a reference center for assisted
reproduction in Fortaleza, Brazil**

Artigo submetido na revista *JBRA Assisted Reproductive*

– Qualis A4 –

Associations among body mass index, waist circumference, lifestyle, health and semen quality of men treated at a reference center for assisted reproduction in Fortaleza, Brazil

Luana Mara S.C. P. da Cunha^{1,2}, Denise D. Guerreiro¹, Messilyana de O. Mesquita⁶, Alexandre D.V. Pinheiro³, Ana Filomena Camacho Santos Daltro^{2,7}, Mário de Quesado Miranda Bezerra², Carla Soraya Costa Maia⁶, Ana Cristina de Oliveira Monteiro Moreira⁷, Sebastião E. Torquato-Filho^{4,5}, Arlindo A.A. Moura^{1,3*}

¹ Department of Animal Science, Federal University of Ceará, Fortaleza, Brazil.

² College of Health Sciences, Department of Nutrition, University of Fortaleza, Unifor, Fortaleza, Brazil.

³ Center for Research and Drug Development, School of Medicine, Federal University of Ceará, Fortaleza, Brazil.

⁴ Human Reproduction Clinic Evangelista Torquato, Fortaleza, Brazil.

⁵ Center of Medicine Reproductive – BIOS, Fortaleza, Brazil.

⁵ Human Reproduction Clinic Evangelista Torquato, Fortaleza, Brazil.

⁶ Graduate Program in Nutrition and Health, State University of Ceara, Fortaleza, Brazil.

⁷ Experimental Biology Center /Nubex, University of Fortaleza, Fortaleza, Brazil.

Abstract

Background: Male obesity, especially central obesity, has been associated to infertility and reduced chances of conception. This central adiposity and increased waist circumference directly affect semen quality. **Objective:** To evaluate the association between body mass index, waist circumference, and lifestyle of men undergoing assisted reproduction treatment, intrauterine insemination, or intracytoplasmic sperm injection, attended at a human reproduction clinic. **Methods:** We approached 98 men undergoing reproductive treatment at a reproductive medicine center from October 2019 to March 2020. Weight (kg), referred height (cm) and waist circumference (cm) were measured at the time of joining the study. A socioeconomic form was applied, including lifestyle in the collection of information. The seminal report was given by the andrologist of the laboratory after semen collection. **Results:** The participants were divided into three groups according to body mass index categorization, namely: eutrophic ($n = 14$) with 14.3%, overweight ($n = 56$) with 57.1%, and overweight with 28.6% of men. The mean age was 37.8 (6.8) years, and the waist circumference was 96.3 (15.3) cm. There was a significant association between body mass index and waist circumference groups ($p < 0.001$), body mass index with family diseases ($p = 0.017$), among which obesity ($p = 0.017$) and diabetes ($p = 0.008$), as well as the use of medications ($p = 0.049$). There was no significant association between body mass index of normozoospermic men and those with altered seminal parameters ($p = 0.619$). **Conclusion:** Familial diseases can lead to central obesity and represent an additional risk of male infertility and, associated with body mass index, harm fertility rates, and, together with the use of medications, reflect changes in health/disease patterns caused by inappropriate eating and lifestyle behaviors.

Keywords: obesity; circumference waist; male infertility; lifestyle.

*Corresponding author: arlindo.moura@gmail.com

Introduction

Infertility is defined as the inability of a couple to conceive a pregnancy after one year or more of regular, unprotected intercourse (WHO, 2018). This reproductive system dysfunction affects about 180 million couples worldwide, and the male factor represents 50% of the causes of infertility (Leslie et al., 2022). According to Piato (1997), it is considered infertility without apparent cause, the couple trying after two years despite a normal clinical evaluation, but without a pregnancy at term. In the study of Mascarenhas et al. (2012), infertility is considered as the absence of pregnancy over five years. Therefore, men diagnosed with infertility should be advised to seek specialized treatment at assisted reproduction clinics (Schlegel et al., 2021).

The causes that can lead to male infertility are several, ranging from biological (urogenital infections, varicoceles, testicular trauma, ejaculatory/erectile disorders), physiological (hormonal disorders), genetic, environmental factors (exposure of the testicles to excessive heat), lifestyle/behavioral (smoking, alcohol intake, drugs, obesity) and socio-demographic (Leslie et al., 2022, Okonofua et al., 2022). Among the lifestyle/behavioral causes, obesity is the chronic non-transmissible disease with the most impact on fertility characterized by an increased body mass index ($\text{BMI} \geq 30 \text{ kg/m}^2$) that can trigger several diseases, such as diabetes mellitus, cardiovascular diseases, eating disorders, metabolic syndrome among others with various consequences for the health of the individual (Genchi et al., 2017; Khan & Hashim, 2020, Sultan et al., 2020). Research indicates that one in five adults become obese by 2025 (NCD-RisC, 2017). Global estimates, reported by the World Obesity Atlas (2023), estimate that in Brazil the projected trend in the prevalence of obesity by 2035 in adults will be 41% with an annual increase of 2.8%. Global overweight and obesity (2020–2035) shows that the proportion of the population that is overweight or obese ($\text{BMI} \geq 25 \text{ kg/m}^2$) will be 51% and the proportion of the population that will be obese ($\text{BMI} \geq 30 \text{ kg/m}^2$) will be 24% (WOF, 2023). Obesity has a negative impact on male fertility leading to changes in spermatogenesis and seminal quality (concentration, motility, and morphology) (Blay et al., 2020), hormonal imbalances such as increased estradiol, reduced testosterone, and inflammatory outcomes due to oxidative stress (Campbell et al., 2015; Katib, 2015, Alshahrani et al., 2016; Leisegang et al., 2020).

Another extremely relevant fact is the increase in waist circumference due to weight gain. According to the World Health Organization, this increase in waist circumference in the American population represented 58.9% of central obesity (CDC, 2023). It is observed that this accumulated fat can be considered a marker of central adiposity with a strong impact on male

fertility, however, there are few studies addressing this matter (Bian et al., 2022). As reported by Li et al. (2019), when the waist circumference is higher, lower are the sperm concentration, implantation, and clinical pregnancy. Another interesting factor is that even in men with normal body mass index, central adiposity can influence pregnancy outcomes and pregnancy rates in patients undergoing assisted reproductive techniques (Bian et al., 2022). The body mass index provides the most useful, though inaccurate population-level measure of obesity, and can be used to estimate the prevalence of overweight and obesity within a population and the associated risks. However, body mass index does not consider the variations in body fat distribution, as it cannot identify them (WHO, 2000). Research carried out by Cunha et al. (2021) showed an inverse association between body mass index and waist circumference with low quality of seminal parameters in infertile men compared to fertile men diagnosed with obesity.

In this sense, excess body adiposity may be related to infertility by increasing the rate of sperm DNA fragmentation, insulin resistance, reduced sex hormone-binding globulin, and increased estradiol levels, reduced leptin and total and free testosterone synthesis, as well as the oxidative stress and inflammatory state that alter fertility and promote epigenetic modifications (Soubry et al., 2016, Barbagallo et al., 2021).

Men diagnosed with overweight and obesity, therefore, have higher rates of azoospermia and oligozoospermia compared to eutrophic men due to reduced testosterone and increased estradiol, which may explain seminal changes, leading to reduced volume, concentration, motility, and morphology of the semen (Bieniek et al., 2016). Thus, the present study aimed to evaluate the relationship between body mass index, waist circumference, and lifestyle of men who attended an assisted reproduction clinic for treatment, such as intrauterine insemination or intracytoplasmic sperm injection.

Material and methods

Study population

The population consisted of male patients who underwent treatment at a reproductive medicine center, intrauterine insemination, or intracytoplasmic sperm injection, from October 2019 to March 2020, aged 18 and 60 years. The study included 98 men who agreed to participate in the study through a direct approach, after signing the Free and Informed Consent Form (TCLE), following the CNS Resolution No. 196/96, which deals with the

protection of participants and guides procedures related to research with humans to know all the procedures to which they will be submitted. Participants were guaranteed anonymity and freedom to withdraw from the study at any time.

Ethical statement

This study was approved by the Ethics and Research Committee of the University of Fortaleza (Unifor) with protocol number: 02451618.3.0000.5052 and report no. 3.049.665 issued on November 30, 2018.

Social data collection, lifestyle and operational definitions

The socioeconomic and lifestyle data of the participants were collected using a specific form with questions on their age, birthplace, ethnicity, marital status, education, profession, number of children, physical activity, diagnosed diseases, diseases in the family, use of medications and nutritional supplements, alcoholism, smoking, physical activity, and time they wanted to have children.

Anthropometric assessment

The anthropometric evaluation was performed by measuring weight (kg) on an Omron® HBF-214 model digital scale with a maximum capacity of 150 kg, according to Frisancho (1990), and height (m) was reported. The nutritional diagnosis was evaluated according to the World Health Organization classification for adults (WHO, 2000).

Body mass index can be considered as a simple index of weight for height commonly used to classify nutritional status as underweight, normal, overweight, and obese in adults, and is defined as weight in kilograms divided by height squared in meters (Kg/m^2). The underweight individual is classified when he has a body mass index below or equal to 18.5, normal between 18.6 and 24.9, overweight between 25 and 29.9, obesity grade I between 30 and 34.9, obesity grade II between 35 and 39.9, and obesity grade III greater than or equal to 40 Kg/m^2 . The WHO classification is based mainly on the association between body mass index and mortality (WHO, 2000).

Waist circumference was taken at the narrowest region of the trunk after a normal expiration, using the midpoint between the iliac crest and the last floating rib to measure body fat, using an inextensible measuring tape (WHO, 2008). Waist circumference values less than 94 cm do not represent a risk of metabolic disorders; however, between 94 and 102 cm represents an increased risk of metabolic complications, and waist circumference > 102 cm, a substantially increased risk of metabolic complications (Abeso, 2016).

Semen collection and analysis of seminal parameters

Semen was collected by masturbation after 2 to 7 days of sexual abstinence in a clean container. After semen collection, the samples were analyzed by the same andrologist. As not all participants performed the sperm analysis in the same laboratory, the seminal laboratory diagnosis was performed after semen collection and confirmed by the specialist physician to guarantee the same analysis conditions and procedures (WHO, 2010). The participants were diagnosed according to changes in seminal parameters: concentration (oligozoospermia), motility (asthenozoospermia), and/or morphology (teratozoospermia) (Supplementary Table 1).

Statistical analysis

Numerical variables were tested for normality and homogeneity using the Shapiro-Wilk and Levene tests, respectively. Categorical variables were presented in frequencies and percentages, and numeric variables in means and standard deviations. The association between BMI classifications and categorical variables of individuals was evaluated using Pearson's chi-square test, and when the observed frequencies were less than five, the likelihood ratio was used. To compare the means of the numerical variables between the body mass index classifications, the ANOVA or Kruskal-Wallis test was performed, according to the distribution of the variables, followed by Tukey's post-test to check for multiple comparisons. The software used for the analyses was the Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) version 22.0. The graphs were made in GraphPad Prism 8.0, with a value of $p < 0.05$ being considered significant.

Results

In the present study, 98 men attended at an assisted reproduction clinic undergoing reproductive treatment with a mean age of 37.8 (6.8) years, categorized according to body mass index, were evaluated. Of these, 14.3% (n=14) were considered eutrophic, 57.1% (n = 56) were overweight and 28.6% (n=28) were obese. The mean weight was 86.1 (13.6) Kg, with a significant difference between the groups ($p < 0.001$) and waist circumference was greater in men defined as obese and overweight ($p < 0.001$) (Table 1).

The difference among the mean weight, waist circumference and body mass index between the nutritional status classifications showed that there was an association of weight between eutrophic and overweight men ($p < 0.001$), as well as overweight and obese ($p < 0.001$). These same results were observed with the body mass index ($p < 0.001$). In terms of waist circumference, there was an association between eutrophic and overweight men ($p < 0.003$), and with overweight and obesity ($p < 0.001$) (Figure 1).

When analyzing the association between diseases in the family and body mass index, our findings showed a significance difference, obesity ($p = 0.017$) and diabetes ($p = 0.008$). Furthermore, regarding the use of medications, the results showed a positive association ($p = 0.049$) (Table 2). In this study, 27 (27.6%) of men reported that they had been diagnosed with some disease, and 34 (34.7%) reported that they made continuous use of medication, among them eutrophic (28.6%), overweight (26.8%), and 53.6% with obesity (Table 2).

The distribution of medications reported by the participants. It is worth mentioning that the sum of the percentages was greater than 100%, considering that many participants used more than one medication. 15.1% of the men used infertility medication, followed by antihypertensive drugs (9.2%) and oral hypoglycemic agents (4.1%) (Supplementary Table 1).

Based on the seminal laboratory diagnosis of the men surveyed, 39.8% were considered normozoospermic, while 60.2% had seminal alterations. Of these, the obese group had semen alterations (67.9%). The eutrophic and overweight groups presented the same percentages of seminal alteration (57.1%). We did not observe an association between body mass index and normozoospermic men and those with seminal alterations ($p = 0.619$) (Table 2). Normozoospermia and teratozoospermia, in the eutrophic group, had the same results (42.9%), while 14.2% of them presented oligozoospermia. In overweight men, oligozoospermia (10.7%) was highlighted, followed by asthenozoospermia and oligoasthenozoospermia, both with 8.9%.

In individuals considered obese, teratozoospermia had a greater (13.3%) and oligozoospermia (11.2%) were the seminal alterations with more manifestations (Supplementary Table 2).

Discussion

The present study associated the nutritional profile and social data of 98 men undergoing reproductive treatment at an assisted reproduction clinic with lifestyle, including physical activity, alcohol consumption, smoking, and seminal characteristics in the Northeast region of Brazil. Most participants were overweight (overweight and obese). Waist circumference, family obesity and diabetes, and medication use were associated with being overweight. This study did not assess the food consumption of the participants, as the vast majority had nutritional monitoring provided by the human reproduction clinic due to reproductive treatment, therefore, this could be a bias in the interpretation of the data.

The association between the mean body mass index of the researched groups reveals similarity to the study by Eisenberg et al. (2014) of 29.8 (5.6) kg/m². This result confirms a pattern of weight gain in men aged between 30 and 34 years, with a mean variation in weight gain (RPV = 19%; $\beta_{\text{year}} = 0.31$ kg/year; $p = 0.003$). The study by Brebal et al. (2020) also showed that more than 70% of men remained obese, and less than 5% became eutrophic after 20 years.

The association between body mass index and waist circumference between the studied groups showed a significant difference. These results confirm the study by Bian et al. (2022), where the increase in circumference between worsened seminal quality, showing an increased search for treatment in reproduction clinics. In this study, 269 men with a mean circumference between of 96 cm had complaints of lower sperm concentration and worse clinical outcomes, with absent and/or reduced pregnancy rates. Additionally, in the study by Eisenberg et al. (2014) with 468 men circumference between (100.8 cm), a linear decline in semen volume, low concentration, and sperm count was observed with increasing circumference between (100.8 cm) and body mass index (29.8 Kg/m²) in the mean age group of 31.8 years. Similar characteristics were observed in our research, enhancing seminal impairment with increased waist circumference. In addition, increased waist circumference represents a substantially increased risk for metabolic diseases, such as diabetes mellitus and cardiovascular diseases (Abeso, 2016).

In our study, diseases reported in the family, obesity and diabetes mellitus were positively associated. These data confirm that these metabolic diseases can arise due to inappropriate eating behavior due to the lifestyle adopted by the family (WHO, 2021), leading to future reproductive problems (Del Giudice et al., 2020, Murshidi et al., 2020, Behboudi-Gandevani et al., 2021). In addition, the onset of these diseases is a consequence of poor eating patterns and behaviors, can be considered a risk factor for infertility, and altered seminal parameters (Mohajan & Mohajan, 2023).

In the present study, we observed a relationship between body mass index and medication use. According to the updated guidelines for the diagnosis and treatment of infertility in men by the American Society for Reproductive Medicine (ASRM), the use of drugs that can improve male health as well as seminal parameters is recommended in order to provide better success in the treatment adopted (Schlegel et al., 2021). In our research, we confirmed that overweight and obese individuals make more use of medication when compared to the eutrophic individuals; however, men in eutrophic condition also made use of medication (28.6%) despite the low percentage of diagnosed diseases in the family (14.3%), so this difference may be due to the type of clinical treatment adopted to improve fertilization success. In addition, the family history of these men may be a risk factor for the onset of overweight and obesity due to changes in dietary patterns and inadequate lifestyle, reflecting the nutritional transition with a declining fertility rate confirmed by the use of drugs, in addition to those used for the treatment of male infertility, the continuous use of drugs to control hypertension and diabetes (Barros et al., 2021). Furthermore, in the struggle for a pregnancy, a couple's life is transformed by psychological/behavioral repercussions, and men are not unaware of the feelings that generate emotional instability, stigmatization, accusation, and pressure from society (Lotti & Maggi, 2018, Fainberg & Kasnianian, 2019, Dourou et al., 2023).

The research results suggest that obesity may be associated with a higher risk of alterations in seminal parameters, such as teratozoospermia and oligozoospermia. Furthermore, as these men were undergoing reproductive treatment, seminal alterations were expected, therefore female causes should have been considered, especially in cases of normozoospermic or eutrophic men with oligoteratozoospermia (Esteves et al., 2021). The most common causes involving the diagnosis of male infertility are the genital tract, smoking and varicoceles (Leaver, 2016). Oxidative stress leads to the inflammatory state found in abdominal obesity, and can be the cause of infertility, causing direct damage to the sperm plasma membrane and consequently changes in sperm concentration, motility and morphology (Bisht et al, 2017, Barati et al., 2020).

The diagnosis of male infertility comprises seminal analysis, hormonal tests and genetic testicles for detailed investigation of the causes for specialized treatment (Assidi, 2022, Botezatu et al., 2022). The search for specialized treatment in the diagnosis of infertility involves several factors. In overweight and obese individuals, understanding these seminal changes is much more complex, as oxidative stress, changes in spermatogenesis (Dong et al., 2022), infections, genetic and epigenetic factors can have a negative role in male fertility and require techniques robust research tools (Craig et al., 2017, Colpi et al., 2018). In this sense, the male and female causes, such as endometriosis or polycystic ovary syndrome, among others that led this couple to seek procedures in reproductive medicine, must have been previously investigated by the specialist in reproduction. Another aspect to be considered is testicular exposure to high temperatures, observed in our region, which cause scrotal hyperthermia leading to changes in spermatogenesis, germ cell apoptosis, oxidative stress and sperm DNA damage (Katz et al., 2017, Durairajanayagam et al., 2018).

The food consumption of research participants was not investigated, as this study is part of a larger research with a proteomic approach to seminal plasma. In addition, the couples assisted at the reproductive medicine center are a unique, differentiated and difficult-to-reach audience. This fact may have been a limitation in the assessment of diet composition, nutritional inadequacies, ingested energy and diet therapy factors that led to weight gain or changes in lifestyle (Boutari & Mantzoros, 2022). Men have, in general, a higher consumption of alcohol, red and processed meats and foods rich in fats, which are associated with worse seminal quality. Analyzing how diet influences, not just the seminal parameters, but other fertility indicators male are needed (Nassan et al., 2018).

Conclusion

Our study showed a strong association between mass index and waist circumference of men seen in an assisted reproduction clinic. There was an association among mass index and family diseases, obesity and diabetes, and medication use. These results suggest that familial illnesses may be a risk factor for male infertility. The use of ongoing medications, in addition to those used in reproductive treatment, reflects inappropriate eating behaviors and/or psychological repercussions experienced by these men that may lead to this weight gain.

It is important to recognize that each couple faces infertility in a unique way. Silence and distance can be caused by several reasons. Some couples may feel shame or stigma

associated with infertility, or they may fear being judged by others. Furthermore, the intimate nature of the reproductive treatment process often leads couples to prefer to keep their experience private. Research in this area is critical to providing more effective and affordable treatment options for couples facing difficulties conceiving due to male infertility.

Acknowledgment

This study was supported by Evangelista Torquato Human Reproduction Clinic and BIOS - Reproductive Medicine Center.

Funding Statement

This study received support from the Laboratory of Animal Physiology at the Federal University of Ceará.

Limitation

Infertility can have a significant impact on a couple's physical and mental well-being. The emotional anguish, frustration and sadness associated with the difficulty of conceiving may have affected adherence and the low number of men available to participate in the research, especially if they are not prepared to deal with these emotions during treatment.

Author contributions

Luana Mara Cunha, Denise Guerreiro, and Sebastião E. Torquato-Filho conceived the idea of the study. Luana Mara Cunha, Messilyana Mesquita, Alexandre Danton, Ana Filomena Daltro and Mário de Quesado helped in the data collection and writing of the manuscript. Ana Cristina de Oliveira, Denise Guerreiro, Carla Soraya Maia, and Arlindo Moura reviewed and provided critical contributions. All authors contributed to the manuscript and agreed on the final design.

Conflict of interest

The authors have no conflict of interest to declare.

References

- Alshahrani, S, Ahmed, AF, Gabr, AH, Abalhassan, M, Ahmad, G. The impact of body mass index on semen parameters in infertile men. *Andrologia*. A 2016 48 (10), pp. 1125-1129. doi:10.1111/and.12549.
- Assidi M. Infertility in Men: Advances towards a Comprehensive and Integrative Strategy for Precision Theranostics. *Cells*. 2022 May 22;11(10):1711. doi:10.3390/cells11101711. PMID: 35626747; PMCID: PMC9139678.
- Associação Brasileira para o Estudo da Obesidade e da Síndrome Metabólica Diretrizes brasileiras de obesidade 2016 / ABESO - Associação Brasileira para o Estudo da Obesidade e da Síndrome Metabólica. – 4.ed. – São Paulo, SP.
- Barati E, Nikzad H, Karimian M. Oxidative stress and male infertility: current knowledge of pathophysiology and role of antioxidant therapy in disease management. *Cell Mol Life Sci*. 2020 Jan;77(1):93-113. doi: 10.1007/s00018-019-03253-8. Epub 2019 Aug 3. PMID: 31377843.
- Barbagallo F, Condorelli RA, Mongioì LM, Cannarella R, Cimino L, Magagnini MC, Crafa A, La Vignera S, Calogero AE. Molecular Mechanisms Underlying the Relationship between Obesity and Male Infertility. *Metabolites*. 2021 Dec 4;11(12):840. doi: 10.3390/metabo11120840. PMID: 34940598, PMCID: PMC8706114.
- Barros D et al. The influence of food and nutritional transition on the increase in the prevalence of chronic non-communicable diseases. *Brazilian Journal of Development* 7.7 (2021): 74647-74664. ISSN: 2525-8761.
- Behboudi-Gandevani S, Bidhendi Yarandi R, Rostami Dovom M, Azizi F, Ramezani Tehrani F. The Association Between Male Infertility and Cardiometabolic Disturbances: A Population-Based Study. *Int J Endocrinol Metab*. 2021 Apr 13;19(2):e107418. doi: 10.5812/ijem.107418.
- Bian H, Mínguez-Alarcón L, Salas-Huetos A, Bauer D, Williams PL, Souter I, Attaman J, Chavarro JE, EARTH Study Team. Male waist circumference in relation to semen quality and partner infertility treatment outcomes among couples undergoing infertility treatment with assisted reproductive technologies. *Am J Clin Nutr*. 2022 Mar 4;115(3):833-842. doi: 10.1093/ajcn/nqab364. PMID: 34734234, PMCID: PMC8895222.

Bieniek JM, Lo KC. Recent advances in understanding & managing male infertility. *F1000Res*. 2016 Nov 24;5:2756. doi: 10.12688/f1000research.9375.1. PMID: 27990271; PMCID: PMC5130065.

Bisht S, Faiq M, Tolahunase M, Dada R. Oxidative stress and male infertility. *Nat Rev Urol*. 2017 Aug;14(8):470-485. doi: 10.1038/nrurol.2017.69. Epub 2017 May 16. PMID: 28508879

Botezatu A, Vladioiu S, Fudulu A, Albulescu A, Plesa A, Muresan A, Stancu C, Iancu IV, Diaconu CC, Velicu A, Popa OM, Badiu C, Dinu-Drăganescu D. Advanced molecular approaches in male infertility diagnosis†. *Biol Reprod*. 2022 Sep 12;107(3):684-704. doi: 10.1093/biolre/ioac105. PMID: 35594455.

Boutari C, Mantzoros CS. A 2022 update on the epidemiology of obesity and a call to action: as its twin COVID-19 pandemic appears to be receding, the obesity and dysmetabolism pandemic continues to rage on. *Metabolism*. 2022 Aug;133:155217. doi: 10.1016/j.metabol.2022.155217. Epub 2022 May 15. PMID: 35584732; PMCID: PMC9107388.

Blay R. M. et al. Influence of Lifestyle and Environmental Factors on Semen Quality in Ghanaian Men. *International Journal Of Reproductive Medicine*, [S.L.], v. 2020, p. 1-7, 21 out. 2020. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/2020/6908458>.

Brebal KMM, Silveira JAC, De Menezes RCE, Epifânio SBO, Marinho PM, Longo-Silva G. Weight gain and changes in nutritional status of Brazilian adults after 20 years of age: a time-trend analysis (2006-2012). *Rev Bras Epidemiol* 2020; 23: E200045. doi: 10.1590/1980-549720200045

Campbell JM, Lane M, Owens JA, Bakos HW. Paternal obesity negatively affects male fertility and assisted reproduction outcomes: a systematic review and meta-analysis. *Reprod Biomed Online*. 2015 Nov;31(5):593-604. doi: 10.1016/j.rbmo.2015.07.012. Epub 2015 Aug 10. PMID: 26380863.

Craig JR, Jenkins TG, Carrell DT, Hotaling JM. Obesity, male infertility, and the sperm epigenome. *Fertil Steril*. 2017 Apr;107(4):848-859. doi: 10.1016/j.fertnstert.2017.02.115. PMID: 28366411.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Chronic Kidney Disease Surveillance System—United States [Internet]. 2023 Available from: <http://www.cdc.gov/ckd>.

- Colpi GM, Francavilla S, Haidl G, Link K, Behre HM, Goulis DG, Krausz C, Giwercman A. European Academy of Andrology guideline Management of oligo-astheno-teratozoospermia. *Andrology*. 2018 Jul;6(4):513-524. doi: 10.1111/andr.12502. PMID: 30134082.
- Cunha LMSCP, Teixeira MYP, Daltro AFCS, Torquato-Filho SE, Assis RC, Celedonio RF, Pires LV, Maia CSC, Guedes MIF. Unbalance of Se and nutritional status in male infertility. *JBRA Assisted Reproduction*. 2021 25 (2): 202–208. doi: 10.5935/1518-0557.20200067.
- Del Giudice F, Kasman AM, Ferro M, Sciarra A, De Berardinis E, Belladelli F, Salonia A, Eisenberg ML. Clinical correlation among male infertility and overall male health: A systematic review of the literature. *Investig Clin Urol*. 2020 Jul;61(4):355-371. doi: 10.4111/icu.2020.61.4.355.
- Dong S, Chen C, Zhang J, Gao Y, Zeng X, Zhang X. Testicular aging, male fertility and beyond. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2022 Oct 13;13:1012119. doi: 10.3389/fendo.2022.1012119. PMID: 36313743; PMCID: PMC9606211
- Dourou P, Gourounti K, Lykeridou A, Gaitanou K, Petrogiannis N, Sarantaki A. Quality of Life among Couples with a Fertility Related Diagnosis. *Clin Pract*. 2023 Feb 9;13(1):251-263. doi: 10.3390/clinpract13010023. PMID: 36826165; PMCID: PMC9955447.
- Durairajanayagam D. Lifestyle causes of male infertility. *Arab J Urol*. 2018 Feb 13;16(1):10-20. doi: 10.1016/j.aju.2017.12.004. PMID: 29713532; PMCID: PMC5922227.
- Eisenberg ML, Kim S, Chen Z, Sundaram R, Schisterman EF, Louis GMB. The relationship between male BMI and waist circumference on semen quality: data from the LIFE study. *Human Reproduction*, 2014. 29 (2), pp.193–200. doi:10.1093/humrep/det428.
- Fainberg J, Kashanian JA. Recent advances in understanding and managing male infertility. *F1000Res*. 2019 May 16;8:F1000 Faculty Rev-670. doi: 10.12688/f1000research.17076.1. PMID: 31143441; PMCID: PMC6524745.
- Frisancho AR. Anthropometric standards for the assessment of growth and nutrition status. The University of Michigan Press: USA. 1990. doi: 10.3998/mpub.12198.
- Genchi VA, Rossi E, Lauriola C, D'Oria R, Palma G, Borrelli A, Caccioppoli C, Giorgino F, Cignarelli A. Adipose Tissue Dysfunction and Obesity-Related Male Hypogonadism. *Int J Mol Sci*. 2022 Jul 25;23(15):8194. doi: 10.3390/ijms23158194. PMID: 35897769, PMCID: PMC9330735.

- Khan MAB & Hashim MJ et al. Epidemiology of Type 2 Diabetes—Global Burden of Disease and Forecasted Trends. *Journal of Epidemiology and Global Health*, 2020 10(1), 107-111.
- Katib A. Mechanisms linking obesity to male infertility. *Central European journal of urology*, 2015 68(1):79-85. doi: 10.5173/cej.2015.01.435.
- Leisegang K, Sengupta P, Agarwal A, Henkel R. Obesity and male infertility: Mechanisms and management. *Andrologia*. 2020 Feb;53(1):e13617. doi: 10.1111/and.13617. Epub 2020 May 12. PMID: 32399992.10.1111/and.13617.
- Leaver RB. Male infertility: an overview of causes and treatment options. *Br J Nurs*. 2016 Oct 13;25(18):S35-S40. doi: 10.12968/bjon.2016.25.18.S35. PMID: 27734725.
- Leslie SW, Soon-Sutton TL, Khan MAB. Male Infertility. In: *StatPearls [Internet]*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2022 Jan—. PMID: 32965929.
- Li MC, Mínguez-Alarcón L, Arvizu M, Chiu YH, Ford JB, Williams PL, Attaman J, Hauser R, Chavarro JE, EARTH Study Team. Waist circumference in relation to outcomes of infertility treatment with assisted reproductive technologies. *Am J Obstet Gynecol*. 2019 Jun;220(6):578.e1-578.e13. doi: 10.1016/j.ajog.2019.02.013. Epub 2019 Feb 11. PMID: 30763543, PMCID: PMC6545132.
- Lotti F, Maggi M. Sexual dysfunction and male infertility. *Nat Rev Urol*. 2018 May;15(5):287-307. doi: 10.1038/nrur.2018.20. Epub 2018 Mar 13. PMID: 29532805.
- Mascarenhas MN, Flaxman SR, Boerma T, Vanderpoel S, Stevens GA. National, regional, and global trends in infertility prevalence since 1990: a systematic analysis of 277 health surveys. *PLoS Med*. 2012;9(12):e1001356. doi: 10.1371/journal.pmed.1001356. Epub 2012 Dec 18. PMID: 23271957; PMCID: PMC3525527.
- Mohajan D, Mohajan HK. Obesity and Its Related Diseases: A New Escalating Alarming in Global Health. *Journal of Innovations in Medical Research*, 2023. 2(3), 12-23.
- Murshidi MM, Choy JT, Eisenberg ML. Male Infertility and Somatic Health. *The Urologic clinics of North America*, 2020, 47(2), 211–217.
- Nassan FL, Chavarro JE, Tanrikut C. Diet and men's fertility: does diet affect sperm quality? *Fertil Steril*. 2018 Sep;110(4):570-577. doi: 10.1016/j.fertnstert.2018.05.025. PMID: 30196939.

NCD Risk Factor Collaboration (NCD-RisC). Worldwide trends in body-mass index, underweight, overweight, and obesity from 1975 to 2016: a pooled analysis of 2416 population-based measurement studies in 128·9 million children, adolescents, and adults. *Lancet*. 2017 Dec 16;390(10113):2627-2642. doi: 10.1016/S0140-6736(17)32129-3. Epub 2017 Oct 10. PMID: 29029897; PMCID: PMC5735219.

Okonofua FE, Ntoimo LFC, Omonkhua A, Ayodeji O, Olafusi C, Unuabonah E, Ohenhen V. Causes and Risk Factors for Male Infertility: A Scoping Review of Published Studies. *Int J Gen Med*. 2022 Jul 4;15:5985-5997. doi: 10.2147/IJGM.S363959. PMID: 35811778, PMCID: PMC9268217.

Piato S. *Tratado de Ginecologia*. São Paulo: Editora Artes Médicas Ltda, 1997. 739p. ISBN-13 ISBN: 978-8574040493.

Soubry A, Guo L, Huang Z, Hoyo C, Romanus S, Price T, Murphy SK. Obesity-related DNA methylation at imprinted genes in human sperm: Results from the TIEGER study. *Clin Epigenetics*. 2016 May 6;8:51. doi: 10.1186/s13148-016-0217-2. PMID: 27158277; PMCID: PMC4859994.

Sultan S, Patel AG, El-Hassani S, Whitelaw B, Leca BM, Vincent RP, le Roux CW, Rubino F, Aywlin SJB, Dimitriadis GK. Male Obesity Associated Gonadal Dysfunction and the Role of Bariatric Surgery. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2020 Jun 19;11:408. doi: 10.3389/fendo.2020.00408. PMID: 32636807; PMCID: PMC7318874.

Schlegel PN, Sigman M, Collura B, De Jonge CJ, Eisenberg ML, Lamb DJ, Mulhall JP, Niederberger C, Sandlow JJ, Sokol RZ, Spandorfer SD, Tanrikut C, Treadwell JR, Oristaglio JT, Zini A. Diagnosis and Treatment of Infertility in Men: AUA/ASRM Guideline Part I. *J Urol*. 2021 Jan;205(1):36-43. doi: 10.1097/JU.0000000000001521. Epub 2020 Dec 9. PMID: 33295257.

World Health Organization (WHO). Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a World Health Organization Consultation. Geneva: World Health Organization, 2000 p. 256. WHO Obesity Technical Report Series, n. 284. ISBN: 9241208945. ISSN: 0512-3054.

World Health Organization (WHO). Waist circumference and waist-hip ratio: report of a WHO expert consultation, Geneva, 8-11 December 2008. World Health Organization Document Production Services, 2011 ISBN: 9789241501491.

World Health Organization (WHO). Laboratory manual for the examination and processing of human semen. Geneva, 2010. 286p.

World Health Organization (WHO). International Classification of Diseases, 11th Revision (ICD-11) Geneva. 2018.

World Health Organization (WHO). Obesity and Overweight. 2021. [Available at: <https://www.who.int/news-room-fact-sheets/detail/obesity-and-overweight.acknowledgements>].

World Obesity Federation (WOF). World Obesity Atlas 2023. <https://data.worldobesity.org/publications/?cat=19>.

FIGURES AND TABLES

Figure 1. Difference between mean weight (A), waist circumference (B) and body mass index (C) averages between nutritional status classifications. P value: post Tukey test.

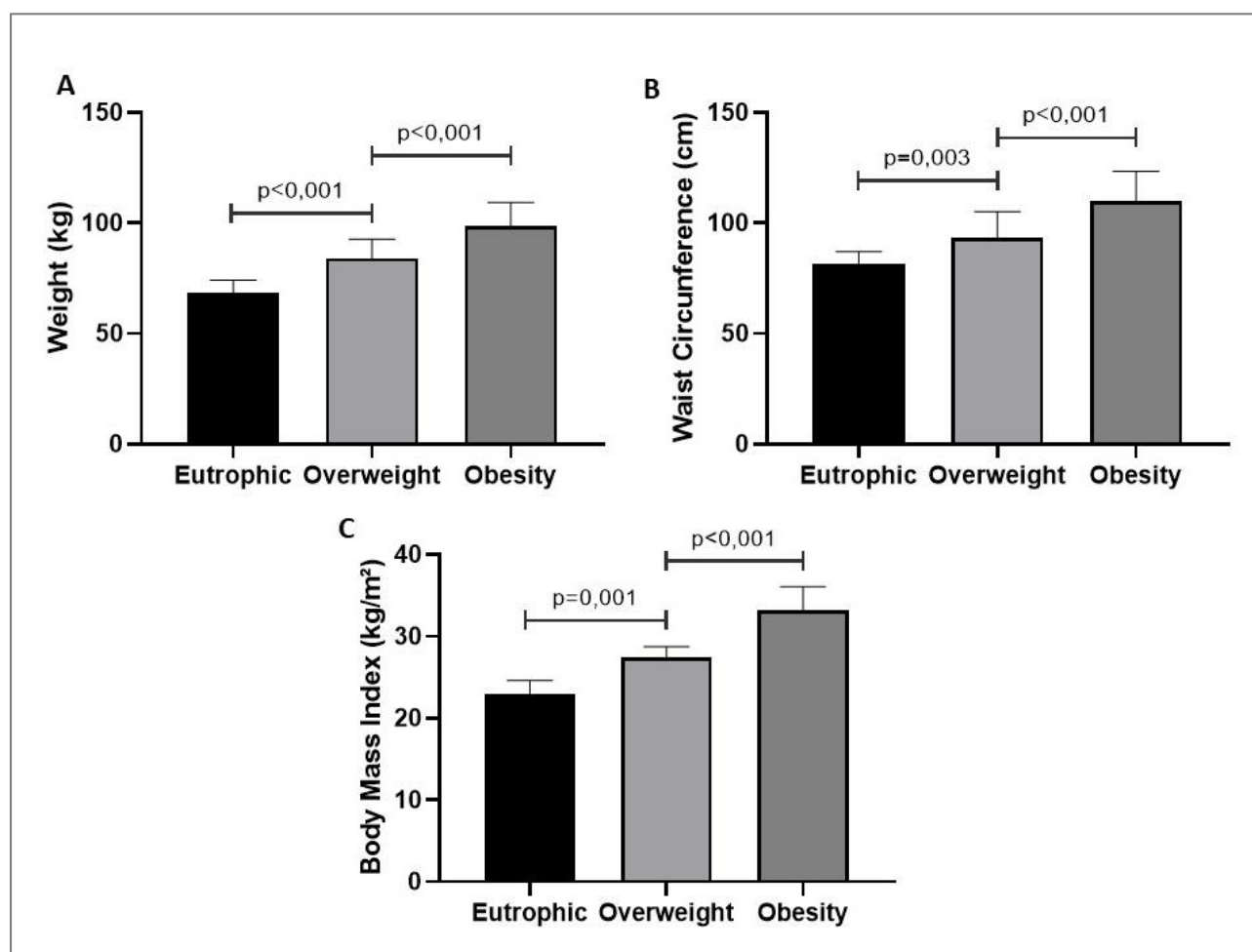


Table 1. Mean and frequency of age, weight, height, waist circumference and body mass index of the research men, by group.

Variables	Total (n = 98)	Eutrophic (n=14)	Overweight (n=56)	Obesity (n=28)	p
Age (years)	37,8 (6,8)	35,9 (3,8)	37,7 (6,9)	38,9 (6,8)	0,375
Weight (kg)	86,1 (13,6)	68,2 (6,0) ^a	84,0 (8,7) ^b	98,5 (10,8) ^c	<0,001
Height (m)	1,7 (0,1)	1,7 (0,1)	1,7 (0,1)	1,7 (0,1)	0,268
Waist circumference (cm)	96,3 (15,4)	81,4 (5,7) ^a	93,3 (11,8) ^b	109,9 (13,4) ^c	<0,001
Body mass index (kg/m ²)	28,4 (2,7)	22,9 (1,7) ^a	27,4 (1,3) ^b	33,2 (2,9) ^c	<0,001£

P-value: ANOVA or Kruskal-Wallis test with Tukey's post test (abc Different letters indicate difference between groups).

Statistical significance: $p < 0.05$.

Table 2. Associations among body mass index, waist circumference, socioeconomic characteristics, lifestyle and sperm parameters, by group.

Characteristics	Total n=98	Body Mass Index (BMI) Kg/m ²			p
		Eutrophic (n=14)	Overweight (n=56)	Obesity (n=28)	
Age (years) n (%)					
24-29	9 (9,2)	1 (7,1)	7 (12,5)	1 (3,6)	0,468
30-34	19 (19,4)	2 (14,3)	9 (16,1)	8 (28,6)	
≥ 35	70 (71,4)	11 (78,6)	40 (71,4)	19 (67,9)	
Self-reported race, n (%)					
White	55 (56,1)	9 (64,3)	27 (48,2)	19 (67,9)	0,186
Others	43 (43,9)	5 (35,7)	29 (51,8)	9 (32,1)	
College education, n (%)					
Yes	31 (31,6)	5 (35,7)	15 (26,8)	11 (39,3)	0,478
No	67 (68,4)	9 (64,3)	41 (73,2)	17 (60,7)	
Sons, n (%)					
Yes	27 (27,6)	1 (7,1)	16 (28,6)	10 (35,7)	0,143
No	71 (72,4)	13 (92,9)	40 (71,4)	18 (64,3)	
Smoking, n (%)					
No	82 (83,7)	13 (92,9)	47 (83,9)	22 (78,6)	0,459 [£]
Ex-smoking	11 (10,2)	0	6 (10,7)	4 (14,3)	
Yes	5 (5,1)	1 (7,1)	3 (5,4)	2 (7,1)	
Alcoholic consumption, n (%)					
Yes	65 (66,3)	6 (42,9)	39 (69,6)	20 (71,4)	0,147 [£]
No	33 (33,7)	8 (57,1)	17 (30,4)	8 (28,6)	
Diagnosed disease, n (%)					
Yes	27 (27,6)	2 (14,3)	17 (30,4)	8 (28,6)	0,441 [£]
No	71 (72,4)	12 (85,7)	39 (69,6)	20 (71,4)	
Diseases in the family, n (%)					
Obesity, n (%)					
Yes	15 (15,3)	0	7 (12,4)	8 (28,6)	0,017 [£]
No	83 (84,7)	14 (100,0)	49 (87,5)	20 (71,4)	
Diabetes n, (%)					
Yes	38 (38,8)	2 (14,3)	19 (33,9)	17 (60,7)	0,008
No	60 (61,2)	12 (85,7)	37 (66,1)	11 (39,3)	
Hypertension, n (%)					
Yes	41 (41,8)	3 (21,4)	26 (46,4)	12 (42,9)	0,235
No	57 (58,2)	11 (78,6)	30 (53,6)	16 (57,1)	
Heart disease, n (%)					
Yes	24 (24,5)	3 (21,4)	15 (26,8)	6 (21,4)	0,829 [£]
No	74 (75,5)	11 (78,6)	41 (73,2)	22 (78,6)	

Cancer, n (%)					
Yes	32 (32,7)	3 (21,4)	19 (33,9)	10 (35,7)	0,600 [£]
No	66 (67,3)	11 (78,6)	37 (66,1)	18 (64,3)	
Others , n (%)					
Yes	1 (1,0)	1 (7,1)	0	0	0,138 [£]
No	97 (99,0)	13 (92,9)	56 (100,0)	28 (100,0)	
Medications in use, n (%)					
Yes	34 (34,7)	4 (28,6)	15 (26,8)	15 (53,6)	0,049 [£]
No	64 (65,3)	10 (71,4)	41 (73,2)	13 (46,4)	
Supplements in use, n (%)					
Yes	39 (39,8)	5 (35,7)	26 (46,4)	8 (28,6)	0,273
No	59 (60,2)	9 (64,3)	30 (53,6)	20 (71,4)	
Physical activity (weekly), n (%)					
No	33 (33,7)	6 (42,9)	17 (30,4)	10 (35,7)	0,836 [£]
1 to 4 week	50 (51,0)	6 (42,9)	29 (51,8)	15 (53,6)	
> 5 week	15 (15,3)	2 (14,3)	10 (17,9)	3 (10,7)	
Waist circumference (cm), n (%)					
< 94	40 (40,8)	14 (100,0)	26 (46,4)	0	<0,001 [£]
94 - 102	30 (30,6)	0	23 (41,1)	7 (25,0)	
> 102	28 (28,6)	0	7 (12,5)	21 (75,0)	
Time you want to have children, n (%)					
< 1 year	17 (17,3)	2 (14,3)	9 (16,1)	6 (21,4)	0,447 [£]
1 to 3 year	50 (51,0)	10 (71,4)	28 (50,0)	12 (42,9)	
> 3 years	31 (31,6)	2 (14,3)	19 (33,9)	10 (35,7)	
Laboratory diagnosis, n (%)					
Normozoospermic	39 (39,8)	6 (42,9)	24 (42,9)	9 (32,1)	0,619
Altered sperm parameters	59 (60,2)	8 (57,1)	32 (57,1)	19 (67,9)	

Data were presented in frequencies (n) and percentages (%) P-values: Pearson's chi-square test or [£]Likelihood ratio (categories variables). Statistical significance: p <0.05.

Supporting information

Supplementary Table 1. Number and frequency of use of reported medications, by group.

Supplementary Table 2. Number and frequency of the altered sperm parameters found in the sperm analysis, by group.

Supplementary Table 1. Number and frequency of use of reported medications, by group.

Reported Medications	Total (n = 98)	Eutrophic (n=14)	Overweight (n=56)	Obesity (n=28)
Type of medicine	n, %			
Unused	59 (60,2)	8 (57,1)	38 (67,8)	13 (46,4)
Antibiotic	1 (1,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (3,6)
Antidepressant	3 (3,1)	1 (7,1)	0 (0,0)	2 (7,1)
Anxiolytic	2 (2,1)	0 (0,0)	1 (1,8)	1 (3,6)
Allergic rhinitis	1 (1,0)	0 (0,0)	1 (1,8)	0 (0,0)
Arthritis	1 (1,0)	0 (0,0)	1 (1,8)	0 (0,0)
Arterial hypertension	9 (9,2)	0 (0,0)	4 (7,1)	5 (17,8)
Asthma	1 (1,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (3,6)
Corticosteroid	1 (1,0)	1 (7,1)	0 (0,0)	0 (0,0)
Gastric protector	2 (2,1)	0 (0,0)	1 (1,8)	1 (3,6)
Heart disease	1 (1,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (3,6)
Hypothyroidism	3 (3,1)	0 (0,0)	1 (1,8)	2 (7,1)
Leprosy	1 (1,0)	0 (0,0)	1 (1,8)	0 (0,0)
Male infertility treatment	15 (15,3)	4 (28,6)	9 (16,1)	2 (7,1)
Oral hypoglycemic	4 (4,1)	0 (0,0)	1 (1,8)	3 (10,7)
Oral hypocholesterolemic	3 (3,1)	0 (0,0)	1 (1,8)	2 (7,1)
TDHA ¹	1 (1,0)	0 (0,0)	1 (1,8)	0 (0,0)

¹Attention deficit hyperactivity disorder

Supplementary Table 2. Number and frequency of the altered sperm parameters found in the sperm analysis, by group.

Laboratory diagnosis	Body Mass Index (BMI) Kg/m ²			Total
	Eutrophic (n=14)	Overweight (n=56)	Obesity (n=28)	
Variable	n, %			
Normozoospermia	6 (42,9)	24 (42,9)	9 (32,2)	39 (39,8)
Asthenozoospermia	0 (0,0)	5 (8,9)	2 (7,1)	7 (7,1)
Teratozoospermia	6 (42,9)	4 (7,1)	3 (10,7)	13 (13,3)
Oligozoospermia	2 (14,2)	6 (10,7)	3 (10,7)	11 (11,2)
Oligoasthenozoospermia	0 (0,0)	3 (5,4)	0 (0,0)	3 (3,1)
Oligoasthenoteratozoospermia	0 (0,0)	4 (7,1)	3 (10,7)	7 (7,1)
Asthenoteratozoospermia	0 (0,0)	2 (3,6)	5 (17,9)	7 (7,1)
Azoospermia	0 (0,0)	3 (5,4)	1 (3,6)	4 (4,1)
Oligoteratozoospermia	0 (0,0)	5 (8,9)	2 (7,1)	7 (7,1)

6 CAPÍTULO II

**Análise proteômica do plasma seminal de homens férteis e com varicocele no
Nordeste, Fortaleza, Brasil.**

**Proteomic analysis of seminal plasma from fertile and varicocele men in the
Northeast of Fortaleza, Brazil.**

Análise proteômica do plasma seminal de homens férteis e com varicocele no Nordeste, Fortaleza, Brasil

Luana Mara S.C. P. da Cunha^{1,2}, Denise D. Guerreiro¹, Messilyana de O. Mesquita⁶, Alexandre D.V. Pinheiro³, Ana Filomena C.S. Daltro^{2,7}, Andrea M. Lima⁴, Gleicyane S. dos Santos⁴, Eduardo G. Sá⁴, Ana Cristina de O. Monteiro Moreira^{2,7}, Sebastião E. Torquato-Filho^{4,5}, Arlindo A.A.Moura^{1,3*}

¹Departamento de Zootecnia e Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza (CE), Brasil.

² Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Nutrição, Universidade de Fortaleza - Unifor, Fortaleza, Brasil.

³ Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza (CE), Brasil.

⁴ BIOS – Centro de Medicina Reprodutiva, Fortaleza, Brasil.

⁵ Clínica de Reprodução Humana Evangelista Torquato, Fortaleza, Brasil.

⁶ Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Saúde, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza (CE), Brasil.

⁷ Centro de Biologia Experimental/Nubex, Universidade de Fortaleza, Fortaleza (CE), Brasil.

Resumo

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) e o Comitê Internacional de Monitoramento em Tecnologias de Reprodução Assistida (ICMART), a infertilidade pode ser conceituada pela incapacidade de concepção de um casal ao longo de 12 meses ou mais com relações sexuais desprotegidas sem concepção ou gravidez a termo, bem como casais que engravidam, mas que abortam e os que buscam tratamento médico. A infertilidade afeta 15 a 20% da população sendo que 50% dessas causas estão relacionadas com o fator masculino, portanto a saúde masculina tem um importante papel na reprodução humana e elucidar as causas e fatores que levam à infertilidade

masculina são importantes para entender o aumento dessa prevalência. Deste modo, o objetivo deste trabalho foi caracterizar o proteoma do plasma seminal de homens atendidos com diagnóstico clínico de varicocele e com parâmetros seminais normais atendidos na clínica de reprodução assistida. Participaram do estudo 19 homens separados em 4 grupos, a saber: normozoospermicos (5), varicocele e astenozoospermia (4), varicocele e teratozoospermia (4) e varicocele e oligoteratozoospermia (6). Foram identificadas 724 proteínas, com destaque para a ANX A3, PRDX1 e CRAC1 no plasma seminal de homens normozoospermicos confirmado como as mais abundantes. No grupo varicocele com astenozoospermia foram identificadas 886 proteínas, no qual as IGLC3, IGLC1 e H2BC1 foram confirmadas como as mais abundantes. No grupo varicocele com oligoteratozoospermia foram identificadas 907 proteínas a TUBB, MSLN e HEX foram confirmadas como as mais abundantes e no grupo varicocele com teratozoospermia foram identificadas 1728 proteínas, nas quais as HSPA1, KIF5C E CLTCL1 foram confirmadas como as mais abundantes. Este estudo fornece a primeira caracterização do proteoma do plasma seminal em homens com varicocele, na qual foi possível identificar proteínas e vias associadas à espermatogênese, metabolismo energético, fertilização, permeabilidade do trato reprodutivo e imunofertilidade. Processos biológicos encontrados nessa pesquisa, como a localização, processos de desenvolvimento e processos celulares indicam uma forte ação e presença de vias relacionadas ao dobramento de proteínas, metabolismo de RNA, miRNA *splicing* associadas ao plasma seminal. Além disso, os miRNAs indicaram funções associadas a diversos processos biológicos, como desenvolvimento embrionário, diferenciação celular, proliferação celular, morte celular programada (apoptose) e resposta a estresses celulares. Este estudo forneceu descrição detalhada do proteoma do plasma seminal, sendo um trabalho descritivo de abordagem e foco nos parâmetros seminais de indivíduos com parâmetros seminais normais e com varicocele.

Keywords: male infertility; spermatozoa; seminal plasma; varicocele; proteome.

Corresponding author: arlindo.moura@gmail.com

Introdução

A infertilidade masculina é uma condição médica que afeta a capacidade de um homem de produzir espermatozoides viáveis e saudáveis, o que pode levar a dificuldades para conceber uma criança naturalmente após 12 meses de relações sexuais desprotegidas (WHO, 2018, Mascarenhas et al., 2012, Gurunath et al., 2011). Existem várias causas possíveis de infertilidade masculina, incluindo problemas hormonais, problemas estruturais nos testículos ou no trato reprodutivo masculino, infecções e exposição a substâncias tóxicas ou medicamentos (Leslie et al., 2023, Agarwal et al., 2021, Shuppe et al., 2017).

Uma das principais patologias de alta incidência em homens inférteis é a varicocele, acometendo aproximadamente 40% dos homens inférteis primários e 80% dos homens inférteis secundários (Jensen et al., 2017, Cho et al., 2016, Pastuszak e Wang, 2015). Além disso, estudos recentes apontam que 3% dos homens são sintomáticos (Agarwal et al., 2023, Kang et al., 2022). Existem três teorias que postulam a origem da varicocele, 1) aumento da pressão hidrostática do plexo pampiniforme, 2) defeitos congênitos nas válvulas e veias com aumento do fluxo sanguíneo (Gat et al., 2005) e 3) compressão da veia renal esquerda (entre a artéria mesentérica superior e aorta abdominal), impedindo o fluxo sanguíneo com aumento dessa pressão hidrostática. Resumidamente, a varicocele consiste em um alargamento patológico do plexo pampiniforme (rede de pequenas veias testiculares que auxiliam no mecanismo de troca de calor do sangue para manter a temperatura testicular) na porção escrotal, podendo afetar negativamente as funções testiculares, como a qualidade do sêmen (Agarwal et al., 2012), hormônios reprodutivos (Lotti et al., 2020) e função espermática (Wang et al., 2009, Thangaraj et al., 2003).

Dentre as funções espermáticas, a varicocele está associada ao comprometimento da espermatogênese na forma de astenozoospermia, que é definida pela proporção de espermatozoides móveis no sêmen, oligozoospermia, alterações na quantidade e teratozoospermia, na forma dos espermatozoides (Agarwal et al., 2023). Além disso, as três alterações simultâneas,

oligozoospermia, astenozoospermia e teratozoospermia, são frequentemente relatadas em homens inférteis (Colpi et al., 2018). Na condição de varicocele, a hipertermia escrotal afeta a temperatura testicular e pode desregular a espermatogênese, pois o testículo requer temperatura mais baixa (2 a 3°C menor do que a temperatura corporal) para esse processo, o que pode ser ainda agravado em casos de obesidade (Hu et al., 2022). O testículo é sensível até mesmo a alterações mínimas na pressão sanguínea, e qualquer aumento na pressão venosa provoca uma vasoconstrição compensatória das arteríolas pré-capilares que ocasionam à hipoperfusão testicular e, assim, reduz o suprimento de oxigênio e nutrientes para o testículo, levando à condição de hipóxia (Sweeney et al., 1991).

Consequentemente, foi demonstrado que o estresse térmico aumenta o estresse oxidativo pela produção das espécies reativas de oxigênio das membranas mitocondriais, citoplasma e peroxissomos, e da mesma forma a hipóxia pode aumentar o estresse oxidativo por meio de reações inflamatórias. Esse desequilíbrio oxidativo causa danos ao DNA, peroxidação lipídica, destruição do sistema antioxidante e apoptose espermática precoce (Ritchie e Ko, 2021). O estresse oxidativo é uma das alterações que leva às mudanças nos parâmetros seminais observado em torno de 40% de homens inférteis (Agarwal et al., 2021, Takeshima et al., 2020, Agarwal et al., 2019), com redução da contagem, motilidade e morfologia dos espermatozoides (Hosseinizadeh et al., 2013).

O processo de espermatogênese é regulado por vários fatores moleculares (genes/proteínas) e está sob rigorosa regulação hormonal (Gunes et al., 2016). Estudos proteômicos recentes em homens inférteis com varicocele clínica relataram várias proteínas diferencialmente expressas relacionadas à estrutura e funções do espermatozoide (Panner et al., 2020). Em um estudo, foi relatado que certas proteínas são expressas exclusivamente no espermatozoide em homens com varicocele. Dentre elas, proteínas como AKAP, CABYR, SEMG1, APOPA1, ACR, RSPH1, SPA17, RSPH9 e DNAH17 foram subexpressas, enquanto as proteínas GSTM3,

DLD, NPC23, TGM4, ODF2GPR64, HIST1H2BA, PSM8 e PARK7 foram superexpressas em homens com varicocele unilateral (Agarwal et al., 2015a). Todas essas proteínas estão envolvidas na motilidade, morfologia, fertilização, função mitocondrial, desintoxicação e regulação do estresse oxidativo.

A função espermática está diretamente relacionada à qualidade do plasma seminal, pois é o principal meio nutritivo para os espermatozóides (Panner et al., 2021a). A expressão anormal de proteínas plasmáticas seminais pode ser um indicador de disfunção espermática nos pacientes com varicocele. Em homens com varicocele, a expressão alterada de proteínas seminais (PRDX2, HSPA2 e APOA2) mostra uma associação com estresse oxidativo e função espermática (Panner et al., 2021b). Além disso, outro estudo revelou que níveis reduzidos de proteínas seminais responsáveis pela regulação da apoptose foram observados em homens com varicocele, indicando baixa qualidade do sêmen (Belardin et al., 2016).

Embora a varicocele possa afetar negativamente o testículo e a função espermática, uma relação conclusiva entre a varicocele como causa ou cofator de infertilidade não foi estabelecida até o momento (Zhang et al., 2022). Nesse sentido, o plasma seminal transmite de forma abrangente as informações fisiopatológicas de vários órgãos reprodutores masculinos (veículos seminais, testículos, glândulas prostáticas e epidídimo), portanto, os fatores seminais têm potencial para serem desenvolvidos como novos biomarcadores não invasivos para a infertilidade masculina associada à varicocele. Assim, estudos sobre a proteômica do plasma seminal são essenciais para a identificação dessas alterações específicas, em um dado momento e ambiente, de forma precisa e minimamente invasiva (Camargo et al., 2013, Zylbersztejn et al., 2013).

Assim, o presente estudo foi conduzido para identificar o proteoma do plasma seminal de homens com laudo seminal normal e varicocele com diferentes padrões espermáticos (oligozoospermia e/ou astenozoospermia e/ou teratozoospermia), utilizando “*label-free mass spectrometry*” e ferramentas de bioinformática.

Casuística e Métodos

Desenho do estudo

Trata-se de um estudo do tipo descritivo, transversal com abordagem quantitativa que avaliou a proteoma do plasma seminal de homens realizado no período de outubro de 2019 a março de 2020 em um Centro de Medicina Reprodutiva em Fortaleza, Ceará. A população foi constituída por indivíduos do sexo masculino com idade entre 18 e 60 anos que aceitaram participar da pesquisa após assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE (ANEXO A) de acordo com a Resolução CNS nº 466/12 que trata da proteção aos participantes e orienta os procedimentos referentes às pesquisas com humanos a fim de conhecer todos os procedimentos aos quais serão submetidos. Foi garantido aos participantes o anonimato e a liberdade de desistência da pesquisa em qualquer momento.

Participantes

Os participantes dessa pesquisa foram 19 homens, divididos em 4 grupos: grupo normozoospermicos (NZ, n=4) e 14 com diagnóstico clínico de varicocele, a saber: varicocele e astenozoospermia (VAZ, n=5), varicocele e teratozoospermia (VTZ, n=4) e varicocele e oligoteratozoospermia (VOTZ, n=6) em tratamento em reprodução humana num centro de medicina reprodutiva que aceitaram participar da pesquisa após abordagem em sala de espera para realização do espermograma.

Procedimentos éticos

Essa pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Universidade de Fortaleza (Unifor) com parecer técnico número 3.049.665 e CCAE: 02451618.3 .0000.5052, emitido em 30 de novembro de 2018 (ANEXO B) com as autorizações do BIOS – Centro de

Medicina Reprodutiva (ANEXO C) e Centro de Reprodução Humana Evangelista Torquato (ANEXO D).

Caracterização antropométrica e sociodemográfica

Avaliou-se o peso (kg) em balança digital (Omron ® modelo HBF-214, fabricante Omron) com estatura referida pelo participante. O índice de massa corpórea (IMC) foi calculado dividindo-se o peso (kg) pela estatura (m) ao quadrado segundo Frisancho (1990). O diagnóstico nutricional foi avaliado segundo a classificação para adultos (WHO, 2000) e a circunferência da cintura (CC) foi aferida na região mais estreita do tronco após uma expiração normal, utilizando o ponto médio entre a crista ilíaca e a última costela flutuante (WHO, 2008). A análise combinada da medida da CC com o IMC pode oferecer uma melhor avaliação de risco, como obesidade, diabetes e doenças cardiovasculares e ajudar a diminuir as limitações de cada uma das avaliações isoladas. Valores menores do que 94 cm da CC não representam risco de complicações metabólicas, CC entre 94 a 102 cm representam risco aumentado de complicações metabólicas e CC > 102 cm, risco substancialmente aumentado de complicações metabólicas (Ross et al., 2020; ABESO, 2016).

Coleta de sêmen e preparação das amostras

O sêmen foi coletado por masturbação com 2 a 7 dias de abstinência sexual em recipiente limpo (Wald et al., 2021, WHO, 2021). Após a coleta, o sêmen foi imediatamente transferido ao laboratório para processamento pelo andrologista. Após liquefação, as amostras foram transferidas para tubo de Falcon (15mL) com pipeta *Pauster* e processadas. Para cada 1mL de sêmen fresco foi adicionado 10µL de inibidor de protease, contendo AEBSF 4-(2-aminoetil) fluoreto de benzenosulfonil, pepstatina A, E-64, bestatina, leupeptina e aprotinina (Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, USA). Em seguida, as amostras de sêmen foram centrifugadas a 700 x g

durante 15 minutos (4°C) e o sobrenadante (plasma seminal), transferido para novos tubos e submetido a nova centrifugação (10.000 x g, 30 min., 4°C). O sobrenadante foi transferido para novos tubos e mantido a – 80°C.

Material e Procedimentos

Análise do sêmen

Alíquotas das amostras de sêmen foram analisadas por dois técnicos distintos na clínica de reprodução assistida, com a geração dos respectivos laudos seminais (WHO, 2021, Kruger et al., 1988). Resumidamente, amostras de sêmen foram homogeneizadas e em seguida, uma alíquota (10µl) foi colocada na câmara de contagem de Makler. Foram realizadas no mínimo duas contagens por campo. Após análise da concentração espermática, o grau de motilidade dos espermatozoides foi avaliado e as amostras, classificadas em grau: A, B, C ou D (imóveis) (WHO, 2021; Tabela Suplementar 1). Este processo foi realizado em duplicata. Para avaliar a morfologia dos espermatozoides, foram utilizados 10 µL previamente homogeneizados e realizados dois esfregaços em lâminas limpas e desengorduradas. Em seguida, as lâminas foram coradas com coloração de Shorr com avaliação de 200 espermatozoides por amostra. A classificação morfológica dos espermatozoides foi realizada segundo critério estrito de *Krüger* (1988).

Preparação das amostras: precipitação e digestão das proteínas do plasma

Amostras de plasma seminal contendo 50µg de proteína solúvel foram precipitadas com clorofórmio/metanol (3:4 v/v). As proteínas foram dissolvidas em um tampão (8 M de ureia e 100 mM de Tris, pH 8,5), reduzidas com hidróclorido de tris (2-carboxietil) fosfina (5 mM) e incubadas em temperatura ambiente por 20 minutos. A alquilação foi realizada no escuro por 15 minutos com 2-cloroacetamida (50 mM). As amostras foram, então, incubadas durante a noite a 37°C em um tampão contendo 2 M de ureia, 0,1 M de Tris pH 8,5, 1 mM de CaCl₂, com tripsina

(proporção final de 1:20, enzima:substrato). Ácido fórmico (5 %) foi adicionado para interromper a reação de digestão e as amostras foram centrifugadas em seguida (17.000 x g, 5 minutos, 4°C). As amostras digeridas foram limpas e concentradas em colunas C18 zip-tip (Waters Inc., USA) e então ressuspensas na fase móvel A (95% de água, 5% de acetonitrila em 0,1% de ácido fórmico), conforme relatado anteriormente (Gomes et al., 2020).

Eletroforese Capilar de Zona (ECZ)

As amostras foram analisadas em um sistema CESI 8000 (Sciex, EUA) acoplado *on-line* a um espectrômetro de massa TimsTOF Pro (Bruker, EUA). Foi utilizado um Kit Adaptador OptiMS com Estágio para Bruker MS (Sciex, EUA) para interfacear o CESI 8000 Plus com o espectrômetro de massa TimsTOF Pro. Um cartucho capilar neutro OptiMS (30 µm de diâmetro interno x 91 cm de comprimento) com uma interface sem bainha foi usado para as separações de ECZ (Sciex). Cada amostra (~10 ng) foi carregada no capilar de CE usando uma pressão de 2,5 psi por 90 segundos. Vinte kV foram aplicados na extremidade de injeção, enquanto a voltagem de eletrospray na ponta foi ajustada para 1,6 kV. O eletrólito de fundo (BGE) era composto por 5% de ácido acético (pH ~2,2).

Cromatografia líquida e espectrometria de mobilidade iônica (IMS)-QTOF

As amostras foram analisadas utilizando um sistema nanoElute LC (Bruker, EUA) acoplado a um espectrômetro de massa TimsTOF Pro (Bruker, EUA). Cada amostra (~350 ng) foi separada em uma coluna de emissor puxado (25 cm x 75 µm de diâmetro interno, C18, 1,6 µm, IonOpticks). A fase móvel A era composta por 95% de H₂O, 5% de ACN em 0,1% de ácido fórmico, enquanto a fase móvel B era composta por 80% de ACN, 20% de H₂O em 0,1% de ácido fórmico. As proteínas foram eluídas utilizando um gradiente linear de 5 a 60% de solvente B ao

longo de 120 minutos, a uma taxa de fluxo constante de 400 nL/min. O forno da coluna foi ajustado para 60°C.

O equipamento TimsTOF Pro foi operado no modo de acumulação paralela - fragmentação em série (PASEF). O software OtofControl (Bruker, EUA) foi utilizado para controlar e sincronizar as operações TIMS e MS, o Compass Hystar 5.0 para aquisição de dados e o software Compass Data Analysis (Bruker, EUA) para processar os dados. Meia-largura dos picos e posições dos picos de mobilidade foram definidos com base em mobilogramas de íons extraídos ($\pm 0,05$ Da) com o algoritmo de detecção de picos embutido no software Compass Data Analysis. O fluxo de ar ambiente do laboratório foi utilizado para a separação de mobilidade iônica e nitrogênio como gás de banho em temperatura ambiente. O fluxo de gás foi mantido em velocidade constante, ajustando a pressão na entrada e na saída do cartucho TIMS. Cinquenta milissegundos foram utilizados para acumular os íons e o potencial de entrada foi aumentado de 180 V para -40 V dentro de 50 ms (435 varreduras TOF de 115 μ s cada) para alcançar a separação de mobilidade iônica aprisionada. Uma única varredura TIMS-MS é composta por muitas varreduras TOF individuais (~ 110 μ s cada). Somações de varreduras TIMS individuais foram utilizadas para aumentar a relação sinal/ruído. Um algoritmo de agendamento PASEF foi utilizado para selecionar íons precursores adequados para PASEF-MS/MS em tempo real a partir das varreduras de levantamento TIMS-MS. Um filtro poligonal foi aplicado ao plano de mobilidade iônica e m/z para distinguir íons de fundo com carga única de íons precursor candidatos de peptídeo. Os dados foram adquiridos com um tempo de rampa de 20 ms e 10 varreduras PASEF MS/MS por ciclo de aquisição de alto N. O valor alvo foi definido como 20.000 a.u. para ambos os métodos CZE e LC. Íons precursor com intensidades inferiores ao valor alvo foram reprogramados para varreduras PASEF-MS/MS até que a contagem de íons somada atinja o valor alvo. Tanto as varreduras MS quanto as MS/MS foram adquiridas com uma faixa de massa de m/z 100 a 1.700. A janela de isolamento do quadrupolo foi definida como 3 m/z. A energia de colisão foi variada entre 30 e 60

e V de acordo com a massa e carga dos precursores. Uma solução de calibração Agilent ESI-L Tuning Mix, com três íons selecionados (m/z 622, 922 e 1.222), foi utilizada para calibrar a voltagem de eluição TIMS e reduzir os coeficientes de mobilidade iônica (Meier et al., 2015, Meier et al., 2018).

Análise de dados

Os dados originais gerados pelo espectrômetro de massa foram convertidos em arquivos MS1 e MS2 usando o Tims TOF Extractor. As identificações e quantificações de proteínas foram realizadas utilizando o Integrated Proteomics Pipeline (IP2; <https://www.integrated-proteomics.com>). Os espectros de MS/MS foram pesquisados com o ProLuCID em um banco de dados do *Homo sapiens* concatenado com uma lista de proteínas contaminantes em arquivos no formato FASTA, usando uma estratégia de alvo-decoy. Para os parâmetros de pesquisa, as tolerâncias de massa precursora e de fragmento foram definidas como 50 ppm, a carbamidometilação de cisteína foi selecionada como modificação estática, enquanto acetilação, monometilação, dimetilação, fosforilações, oxidação e ubiquitinação foram selecionadas como modificações variáveis. Os resultados da pesquisa foram filtrados usando o DTASelect, onde a filtragem exigia uma taxa de descoberta de proteínas falsas (FDR) $<1\%$, um mínimo de 2 peptídeos por proteína e um desvio de massa precursora em relação à massa calculada teoricamente ≤ 5 ppm. As modificações foram validadas automaticamente usando o LuciPHOr 30 e a quantificação livre de rótulos foi realizada no nível MS1 com o Census. Nessa estratégia quantitativa, a abundância da proteína foi medida com base na integração das áreas de pico cromatográficas de todos os peptídeos de uma determinada proteína. Varreduras MS1 foram usadas pelo Census para alinhamento usando alinhamento dinâmico de tempo e reconstrução do cromatograma, onde a medição da abundância de íons em tempos de retenção específicos para um determinado peptídeo

ionizado foi baseada na área sob a curva. A normalização das abundâncias proteicas foi obtida pela soma de todos os peptídeos medidos em uma amostra específica.

Ontologia gênica, análise de clusters funcionais

Os genes foram selecionados para modulação do potencial por miRNAs, usando o conjunto de dados *Homo sapiens* miRBAs (<http://www.mirbase.org>) (Kozomara e Griffiths-jones, 2011) e servidor miRNet 2.0 (<https://www.mirnet.ca>) (Chang et al., 2011). A análise da ontologia gênica (processo biológico, função molecular e componentes celulares) do conjunto de proteínas detectadas foi realizado através do Panther 17.0 (<http://www.pantherdb.org>), usando o banco de dados UniProtKB (Pathan et al., 2015). A plataforma GeneMANIA (<http://genemania.org/search/>) foi utilizada para construir uma rede de interação gene-gene e avaliar as funções das proteínas únicas em cada grupo de homens.

Clusters funcionais associados a proteínas do plasma seminal foram analisados por meio da plataforma Metascape (<https://metascape.org>) de acordo com pontuações de enriquecimento e valores p (Zhou et al., 2019). Metascape (<https://metascape.org>) foi utilizado para análise *in-silico* na interação proteína-proteína com base em previsões coletadas de associações diretas (físicas) ou indiretas (funcionais) das proteínas identificadas, integrando evidências do contexto genômico, co-expressão e dados da literatura.

Análise estatística

As variáveis numéricas foram testadas quanto a sua normalidade e homogeneidade pelos testes de *Shapiro-Wilk* e *Levene*, respectivamente. Para a comparação entre as médias foi realizado o teste ANOVA ou *Kruskal-Wallis*, de acordo com a distribuição das variáveis, seguido do pós-teste de *Tukey* ou *Dunnet* (gráficos) para verificação de comparações múltiplas. A associação entre as variáveis categóricas foi realizada pelo teste Qui-quadrado de *Pearson*. Os

gráficos foram feitos no *GraphPad Prism* versão 8.0 e as demais análises no programa *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS) versão 22.0, sendo considerado significativo o valor de $p < 0.05$.

Resultados

Nesse estudo, foram avaliados 19 indivíduos do sexo masculino que realizaram espermograma no centro de medicina reprodutiva. Os participantes foram divididos em quatro grupos de acordo os parâmetros seminais concentração, motilidade e morfologia espermática (WHO, 2021) e diagnóstico de varicocele. A média de idade e o peso dos homens de cada grupo de estudo foram 35,9 (6,4) anos e 86,5 (12,1) kg, respectivamente (Tabela 6). O IMC dos participantes do grupo varicocele e astenozoospermia foi de 31,6 (1,3) Kg/m² e apresentou valor maior ($p = 0,034$) do que o IMC avaliado nos homens com varicocele e teratozoospermia de 26,7 (3,4) Kg/m² (Figura 4). Homens do grupo varicocele e oligoteratozoospermia apresentaram maior incidência de sobrepeso do que homens varicocele e teratozoospermia (18,2%) e o maior percentual de obesidade foi observado no grupo de indivíduos com varicocele e astenozoospermia (66,7%) quando comparado aos demais (Tabela 6). Entretanto, não foram observadas diferenças significativas de valores de circunferência da cintura entre os grupos (Tabela 6).

Os parâmetros seminais dos participantes, em seus respectivos grupos, são mostrados na Tabela Suplementar 2. A concentração espermática avaliada nos homens do grupo varicocele e teratozoospermia ($34,2 \times 10^6/\text{mL}$) foi superior ($p = 0,018$) aos valores quantificados nos indivíduos diagnosticados com varicocele e oligoteratozoospermia ($4,3 \times 10^6/\text{mL}$) (Figura 5A). A motilidade progressiva (%), foi significativamente inferior ($p < 0,05$) no grupo varicocele com astenozoospermia (18,3%) quando comparados aos grupos sem alterações seminais (44,9%) e varicocele teratozoospermia (35,5 %) (Figura 5B). Os homens com normozoospermia

apresentaram média do critério estrito de *Kruger* normal (Figura 5C) acima dos demais indivíduos (grupos VAZ, VTZ e VOTZ) e menores valores de *Kruger* patológico (Figura 5D).

As análises realizadas por LC-MS/MS permitiram a identificação de 724, 1728, 886 e 907 proteínas no plasma seminal de homens diagnosticados nas categorias NZ, VTZ, VAZ e VOTZ, respectivamente (Tabela Suplementar 3). Destas, foram identificadas 18 (NZ), 266 (VTZ), 55 (VAZ) e 15 (VOTZ) proteínas únicas em cada grupo, enquanto 213 proteínas apresentaram expressão comum no plasma seminal de todos os homens (Figura 6, Tabela Suplementar 4). De acordo com a variável “*spec count*”, identificou-se as 15 proteínas mais abundantes no plasma seminal de cada grupo (Tabelas 6-9). As três proteínas mais abundantes no plasma seminal dos homens diagnosticados com normozoospermia foram identificadas, como *Annexin A3* (ANXA3), *Peroxiredoxin-1* (PRDX1) e *Cartilage acidic protein 1* (CRAC1) (Tabela 6). No que se refere ao grupo VAZ, ressaltam-se as proteínas *Immunoglobulin lambda constant 7* (IGLC3), *Immunoglobulin lambda-like polypeptide 5* (IGLC1) e *Histone H2B type 1-A* (H2BC1) (Tabela 7) e no grupo VOTZ, as três proteínas mais abundantes foram *Tubulin alpha* (LOC782966), *Mesothelin* (MSLN) e *Beta-N-acetylhexosaminidase* (HEXB) (Tabela 8). As proteínas *Heat shock 70 kDa protein 1* (HSPA1), *Kinesin heavy chain isoform 5C* (KIF5C) e *Clathrin heavy chain 2* (CLTCL1) foram identificadas como as mais abundantes no plasma seminal dos homens do VTZ (Tabela 9).

A interação das proteínas do grupo NZ (ANXA3, PRDX1 e CRAC1), VTZ (HSPA1B, KIF5C e CLTCL1), VAZ (H2BC1) e VOTZ (MSLN e HEXB) foram avaliadas por meio da plataforma GeneMANIA. Entre as proteínas únicas de cada grupo e suas proteínas de interação, descobrimos que 77,64% apresentaram características físicas de interação, 8,01% co-expressão e 5,37% foram preditas. Outros resultados, incluindo domínios de proteína compartilhados, co-localização e interação genética são mostrados na Figura 7. No grupo NZ, observou-se que as funções da proteína PRDX1 estavam associadas às atividades antioxidantes, detoxificação celular,

resposta ao estresse oxidativo. A proteína CRAC1 apresentou funções de regulação extracelular negativa da transdução de sinal (Figura 7A) e a proteína AR (*androgen receptor*), redes de interação de co-expressão com ANXA3, PRDX1 e CRAC1 (Figure 7A). Para o grupo VTZ, foi observado que as funções da proteína HSP 1 estavam associadas à resposta celular ao calor, resposta ao estresse oxidativo, regulação negativa da via de sinalização apoptótica e via de sinalização apoptótica intrínseca. As funções para KIF5C estavam relacionadas ao transporte axo-dendrítico e a proteína CLTC1 apresentou funções referentes à vesícula endocítica e a ligação de clatrina (Figura 7B). No grupo VAZ, a proteína H2BC1 estava ligada às funções de organização do nucleossomo, montagem ou desmontagem da cromatina, organização da subunidade do complexo proteína-DNA, DNA *packaging*, remodelamento da cromatina, alteração na conformação do DNA e remodelação da cromatina dependente de ATP (Figura 7C). Finalmente, no grupo VOTZ, foi observado que as proteínas MSLN e HEXB apresentaram rede em comum com a proteína IDUA, sendo esta co-expressa com MSLN e com interações físicas e genéticas com a HEXB. Além disso, HEXB apresentou funções referentes ao processo catabólico derivado de carboidrato, atividade de hidrolase, processo catabólico glicolípídico, lúmen vacuolar e processo catabólico lipídico da membrana (Figura 7D).

A interação das proteínas do grupo NZ (ANXA3, PRDX1 e CRAC1), VTZ (HSPA1B, KIF5C e CLTCL1), VAZ (H2BC1) e VOTZ (MSLN e HEXB) foram avaliadas através da plataforma GeneMANIA. Entre as proteínas únicas de cada grupo e suas proteínas de interação, observamos que 77,64% apresentaram características físicas de interação, 8,01% co-expressão, 5,37% foram preditas. Outros resultados, incluindo domínios de proteína compartilhados, co-localização e interação genética são mostrados na Figura 8. No grupo NZ, observou-se que as funções da proteína PRDX1 estavam associadas às atividades antioxidante, detoxificação celular, resposta ao estresse oxidativo. A proteína CRAC1 apresentou funções regulação extracelular negativa da transdução de sinal (Figura 7A) e a proteína AR (*androgen receptor*), redes de

interação de co-expressão com ANXA3, PRDX1 e CRAC1 (Figure 7A). Para o grupo de homens com varicocele e teratozoospermia, foi observado que as funções da proteína HSP 1 estavam associadas a resposta celular ao calor, resposta ao estresse oxidativo, regulação negativa da via de sinalização apoptótica e via de sinalização apoptótica intrínseca, as funções do componente KIF5C estavam relacionadas ao transporte axo-dendrítico e a proteína CLTC1 apresentou funções referentes à vesícula endocítica e ligação de clatrina (Figura 7B). No grupo de homens com varicocele e astenozoospermia, a proteína H2BC1 estava ligada às funções de organização do nucleossomo, montagem ou desmontagem da cromatina, organização da subunidade do complexo proteína-DNA, DNA packaging, remodelamento da cromatina, alteração na conformação do DNA e remodelação da cromatina dependente de ATP (Figura 7C). Finalmente, as proteínas MSLN e HEXB expressas no plasma seminal de indivíduos com varicocele e teratozoospermia apresentaram interação com a proteína IDUA, sendo esta co-expressa com MSLN e com interações físicas e genéticas com a HEXB. Além disso, HEXB apresentou funções referentes ao processo catabólico derivado de carboidrato, atividade de hidrolase, processo catabólico glicolípídico, lúmen vacuolar e processo catabólico lipídico da membrana (Figura 7D).

Análise de enriquecimento funcional

A análise de enriquecimento funcional das proteínas foi realizada de acordo com a plataforma Metascape (Figura 8). Neste caso, as proteínas foram avaliadas em separado, para grupo fenotípico definido na pesquisa: NZ (724 proteínas), VTZ (1728 proteínas), VAZ (886 proteínas) e VOTZ (907 proteínas). No grupo NZ, houve um acentuado enriquecimento dos “clusters” classificados como degranulação de neutrófilo (63 genes), hemostasia (46 genes) e via do sistema proteassômico *parkin-ubiquitina* (25 genes) (Figura 8A e B, Tabela Suplementar 4). Para o grupo VTZ, os resultados mostraram significativo enriquecimento para degranulação de neutrófilo (113 genes), transporte mediado por vesículas (90 genes) e hemostasia (84 genes)

(Figura 8C e D, Tabela Suplementar 4). No grupo VAZ, as vias mais enriquecidas estiveram relacionadas com degranulação de neutrófilo (74 genes), hemostasia (56 genes) e ciclo de chaperonas HSP90 para receptores de hormônios esteróides na presença de ligante (30 genes) (Figura 8E e F, Tabela Suplementar 5). No caso das proteínas do plasma seminal de homens do grupo VOTZ, encontrou-se as mesmas vias associadas às proteínas do grupo VAZ, tais como degranulação de neutrófilo (77 genes), hemostasia (57 genes) e ciclo de chaperonas HSP90 para receptores de hormônios esteróides na presença de ligante (24 genes) (Figura 8G e H, Tabela Suplementar 5).

Previsão de miRNA alvo de genes no plasma seminal humano

Os genes das proteínas consideradas exclusivas para cada grupo de homens foram analisados pelo módulo explorador do servidor miRNet, utilizando o banco de dados para próstata (Figura 9, Tabela 11). No grupo NZ, os miRNAs associados ao controle da expressão dos genes ANXA3 e PRDX1 modulam a expressão de genes envolvidos na via de sinalização mediada por hormônios (5 miRNA), toxicidade (4 miRNA), divisão celular (3 miRNA), desenvolvimento embrionário (2 miRNA) e efluxo de colesterol (1 miRNA) (Figura 10A). Para o grupo VTZ (genes HSPA1B and KIF5C), os miRNAs estavam envolvidos na expressão de genes que regulam as vias de morte celular (7 miRNA), diferenciação celular (7 miRNA), inflamação (6 miRNA), apoptose (5 miRNA) e desenvolvimento embrionário (3 miRNA) (Figura 9B). Os resultados do grupo VAZ (H2BA), mostraram que os miRNAs recuperados modulam a expressão de genes envolvidos na morte celular e danos ao DNA (2 miRNA, respectivamente), estresse oxidativo, inflamação e apoptose (1 miRNA, respectivamente) (Figura 9C). No grupo VOTZ (MSLN), foram encontrados apenas 3 miRNAs, como o hsa-mir-21-5p que participa da regulação gênica das vias de estresse oxidativo, toxicidade, desenvolvimento embrionário, morte celular e motilidade celular (Figura 9D).

Discussão

A infertilidade masculina tem uma variedade de causas, incluindo mutações genéticas, estilo de vida, doenças ou medicamentos, dentre outros fatores. Apesar dos avanços na compreensão da infertilidade masculina, muitos aspectos moleculares que envolvem as anormalidades espermáticas ainda não são bem esclarecidos. Nesse sentido, realizou-se o primeiro estudo sobre infertilidade de homens com varicocele no estado Ceará, Brasil, por meio de uma avaliação antropométrica e abordagem abrangente do proteoma do plasma seminal de homens com varicocele e diferentes padrões espermáticos (oligozoospermia e/ou astenozoospermia e/ou teratozoospermia). Nesse sentido, a obesidade masculina tem sido relacionada à reprodução devido a efeitos sobre a estrutura molecular e física do espermatozoide (Salas-Huetos et al., 2017; Palmer et al., 2012; Mitchell et al., 2011).

Em nosso estudo, verificou-se que a maioria dos homens apresentava sobrepeso e obesidade, sendo o IMC médio dos grupos estudados de 28,4 kg/m² (OMS, 2018). A associação entre a obesidade e infertilidade masculina deve-se provavelmente a alterações hormonais secundárias causadas por estas condições (Fainberg et al., 2019). Conforme um estudo realizado por Bieniek et al. (2016), existe uma relação inversa entre IMC e testosterona, razão testosterona/estradiol, volume ejaculado, concentração espermática e morfologia. Os mesmos autores também relataram maior ocorrência de azoospermia e oligozoospermia entre homens obesos (12,7% e 31,7%, respectivamente) em comparação com homens de peso normal (9,8% e 24,5%). Além disso, casais formados por um homem com sobrepeso ou obeso e parceira de IMC normal têm maior tempo para conceber em comparação com casais em que ambos os parceiros têm peso normal (Bieniek et al., 2016). Vale reforçar que, no presente estudo, 89,5 % dos homens inférteis tinham sobrepeso ou obesidade, sendo 49,7 % diagnosticados com varicocele. Tal fato nos leva a concluir que o estilo de vida exerce influência sobre função espermática e, consequentemente, sobre a fertilidade masculina.

Homens diagnosticados com varicocele e oligoteratozoospermia apresentaram concentração espermática inferior ($4,3 \times 10^6/\text{mL}$) em relação aos homens com varicocele teratozoospermia ($34,2 \times 10^6/\text{mL}$). A teratozoospermia é definida como uma porcentagem de espermatozoides morfolologicamente normais abaixo do limite inferior de referência (Coutton et al., 2015). Nesse sentido, indivíduos com essa classificação no espermograma podem ter uma grande concentração de espermatozoides com uma ampla gama de fenótipos espermáticos anormais que afetam, única ou simultaneamente, a cabeça, pescoço, peça intermediária e cauda (Chemes e Rawe, 2003). A oligoteratozoospermia é uma combinação de defeitos espermáticos qualitativos e quantitativos, ou seja, baixa concentração de espermatozoide e anormalidade espermática. Além dessas alterações seminais, a astenozoospermia é um fenótipo onde os espermatozoides apresentam motilidade comprometida, causadas principalmente devido anormalidades dos flagelos espermáticos (Coutton et al., 2015). Dessa forma, observamos que espermatozoides de homens do grupo varicocele e astenozoospermia apresentaram menor percentual (18,3%) de motilidade progressiva em relação aos outros grupos avaliados.

Métodos de espectrometria e ferramentas de bioinformática permitiram a identificação de 724, 1728, 886 e 907 proteínas no plasma seminal dos homens diagnosticados com normozoospermia (NZ), varicocele e astenozoospermia (VAZ), varicocele e teratozoospermia (VTZ), varicocele e oligoteratozoospermia, respectivamente. Destas proteínas, foram identificadas 18 (NZ), 266 (VTZ), 55 (VAZ) e 15 (VOTZ) proteínas únicas em cada grupo. Dentre as proteínas únicas, ANXA3, PRDX1 e CRAC1 apresentaram expressão maior no plasma seminal dos homens normozoospermicos. ANXA3 é uma proteína dependente de cálcio e desempenha um papel na regulação do crescimento e sinalização celular (Lu et al., 2014). Estudo conduzido por Park e Pang (2021) identificou 315 proteínas com padrões diferentes de expressão em homens férteis e inférteis e as proteínas ANXA3 e PRDX1 apresentaram maior abundância nos espermatozóides de indivíduos inférteis. Além disso, um estudo observou alta expressão de ANXA2 e PRDX2 nos

espermatozoides de homens inférteis normozoospermicos em comparação aos indivíduos inférteis (Panner et al., 2021). As peroxirredoxinas (PRDXs) são as principais enzimas antioxidantes dos espermatozoides de mamíferos e são oxidadas por tiol e inativadas por EROs de maneira dose-dependente (Gong et al., 2012). No plasma seminal humano e no espermatozoide, a PRDX1 foi identificada pela primeira vez por O'Flaherty e Souza (2011) e autores sugeriram que esta enzima faz parte dos mecanismos de defesa antioxidante necessários para proteger os espermatozóides ejaculados contra altos níveis das EROs. O estresse oxidativo é prejudicial à capacidade de fertilização dos espermatozoides (Agarwal et al., 2014) e a expressão de PRDX no plasma seminal é uma das estratégias de proteção espermática. Como se sabe, a obesidade está correlacionada com aumento das EROs devido ao acúmulo de tecido adiposo que induz a liberação de citocinas pró-inflamatórias, aumento da produção das EROS em leucócitos e aumento da temperatura dos testículos (Perez-Crespo et al., 2008). Resultados do presente estudo, indicam que homens com varicocele e parâmetros espermáticos anormais possuem reduzido nível de PRDX 1, em contraste com indivíduos normozoospermicos. É possível que as condições de sobrepeso e obesidade, associadas à ocorrência de varicocele, causem, direta ou indiretamente, redução da expressão de PRDX 1. Este cenário produz um ambiente propício à geração das EROS e, como consequência, maiores danos às células espermáticas.

A proteína CRAC1 (também conhecida como GREM 1) foi detectada com elevada expressão no plasma seminal dos indivíduos do grupo NZ em comparação com os integrantes dos demais grupos com varicocele e anomalias espermáticas. A molécula denominada Cartilage acidic protein 1 participa da regulação dos processos de sinalização mediados por Ca^{2+} e está envolvida no crescimento, diferenciação e desenvolvimento celular, e com antagonismo à atividade de proteínas morfogenéticas ósseas (Li et al., 2017). As BMPs são expressas em células germinativas testiculares durante a espermatogênese, sendo necessárias ao processo de diferenciação das células espermáticas (de Rooij et al., 2009) e durante a embriogênese (Wang et al., 2014). Outro estudo

observou elevada expressão de CRAC1 nas células de *Leydig*, possivelmente indicando um envolvimento na produção de hormônios sexuais (Laurila et al., 2013). Portanto, as associações da ANXA3 e PRDX1 com o fenótipo de normozoospermia devem-se, provavelmente, às funções destas moléculas em eventos cruciais para a sobrevivências das células espermáticas antes e após a ejaculação, incluindo os processos de capacitação espermática, regulação do Ca^{2+} e controle do estresse oxidativo. O presente estudo é o primeiro a reportar a expressão da proteína CRAC1 no plasma seminal de humanos. Porém, pesquisas adicionais são necessárias para estabelecer as exatas relações desta molécula com a função espermática e fertilidade masculina.

As proteínas mais abundantes no plasma seminal de homens com varicocele e teratozoospermia foram identificadas como HSPA1, KIF5C e CLTCL1. As HSPA1 são chaperonas envolvidas na homeostase de processos celulares como apoptose, senescência, autofagia e resposta imunológica (Sojka et al., 2019). No sêmen humano, a isoforma HSPA2 é considerada um biomarcador de *status* de espermatogênese e fertilização (Nowicka-Bauer et al., 2022). A HSPA1, homóloga da HSPA2, tem alta abundância nos testículos sendo encontrada na peça intermediária dos espermatozóides com relevante papel de indutor ao estresse (Grassi et al., 2022). Nossos resultados foram consistentes em afirmar que no grupo varicocele e teratozoospermia, a HSPA1 pode ser considerada um biomarcador de infertilidade, pois reflete os efeitos da varicocele e obesidade no aumento da temperatura testicular e/ou desregulação do sistema antioxidante no plasma seminal (Fraczek et al., 2020). Esse cenário reduz a sensibilidade do receptor de andrógeno à testosterona e induz o estresse oxidativo, prejudicando a espermatogênese (Pini et al., 2020; Shen et al., 2019; Martínez-Heredia et al., 2008). No mesmo grupo varicocele com teratozoospermia, também encontramos a KIF5C, cuja principal função é regular a fusão vesicular e endocitose essenciais para o funcionamento dos exossomos ou vesículas extracelulares (Machtinger et al., 2016). As proteínas exossomais encontradas no plasma seminal (prostassomas e epididimossomas) estão relacionadas com a motilidade espermática, capacitação,

reação acrossômica e fertilização, porém em condições patológicas e fisiológicas sua função apresenta-se alterada (Baskaran et al., 2020). Atualmente, os exossomos de sêmen também são capazes de desempenhar um papel importante na reprodução de mamíferos masculinos como candidatos a biomarcadores para a identificação de pacientes com azoospermia, hipospermia e teratozoospermia ou outra infertilidade masculina (Candenas e Chinease, 2020). Entretanto, a KIF5C não é frequentemente encontrada no plasma ou fluido seminal e apenas um estudo relatou a subexpressão dessa proteína no plasma seminal de homens com varicocele unilateral (Panner et al., 2021). Em nosso estudo, acredita-se que a abundância da KIF5C no plasma seminal de indivíduos com varicocele e teratozoospermia esteja relacionada ao papel imunossupressor dos exossomos seminais (Sousa et al., 2017), pois a varicocele desencadeia resposta inflamatória e imune. Outra proteína característica do mesmo grupo de homens com varicocele e teratozoospermia foi identificada como CLTCL1, a qual participa de processos como endocitose e medeia funções celulares importantes, como absorção de nutrientes, excitabilidade, transmissão sináptica, ativação de vias de sinalização, recuperação de proteínas e reciclagem de componentes de membrana (McMahon e Boucrot, 2011) e faz parte do revestimento das depressões e vesículas na endocitose (Beattie et al., 2000). Um fato interessante é que essa proteína foi encontrada nos espermatozoides testiculares e no epidídimo de macacos que possuíam sítios de ligação específicos nas vesículas revestidas semelhantes à clatrina (Gerard et al., 1991). Curiosamente, uma pesquisa inédita com isoimunização ao espermatozoides de um paciente infértil com lúpus eritematoso sistêmico mostrou que a presença de anticorpo monoclonal anti-clatrina no soro reconhece antígenos espermáticos localizados na peça intermediária e na cauda de espermatozoides ejaculados. Isso causou aglutinação devido a uma reação cruzada (Domagala et al., 2011). Esses estudos embasam várias hipóteses sobre a abundância de CLTCL1 no plasma seminal do grupo varicocele e teratozoospermia, pois a presença da varicocele e obesidade podem ocasionar a produção de

anticorpos reativos à CLTCL1, bem como alteração ou perda da função da endocitose e funções celulares (Domagala et al., 2011, McMahon e Boucrot, 2011, Garcia et al., 2001).

No grupo varicocele e astenozoospermia, observamos como proteínas únicas mais abundantes a IGLC3, IGLC1 e H2BC1. A IGLC3 é uma proteína dímera de cadeia leve com 25 kDa, contendo quatro subtipos caracterizados pela diferença na sequência de aminoácidos na região constante do anticorpo (Gurmukh et al., 2022). Tem função de se ligar aos antígenos e mediar funções efectoras como neutralização ou eliminação de bactérias, vírus e/ou fungos. Em condições normais, as cadeias leves têm resposta policlonal, mas em situações patológicas, um clone se destaca e suprime os demais (Gurmukh et al., 2022). Acredita-se que a expressão da IGLC3 inibe a atividade proteolítica da fosfatase ácida prostática (PSA/KLK3), reduzindo a motilidade dos espermatozoides devido ao não rompimento do coágulo ligado na superfície dos espermatozoides (de Lamirande, 2007), rompimento da barreira hematotesticular e produção de anticorpos antiespermatozoides, causando infertilidade (Leathersich e Hart, 2022). Nosso estudo detectou a presença da IGLC1 no plasma seminal de homens com varicocele e astenozoospermia. A proteína IGLC1 tem função semelhante ao complemento 3 e está envolvida em mecanismos inatos de seletividade de antígenos como fagocitose, resposta humoral adequada e resistência aos patógenos (Sahu e Lambris, 2001). Nossos resultados sugerem que a expressão de IGLC1 ativa o sistema complemento envolvido na resposta imune adaptativa, promovendo fagocitose e cascata inflamatória, mas também se relaciona com uma expressão fenotípica decorrente de mutações específicas pela síndrome da insensibilidade androgênica, uma resistência ao receptor de andrógeno pela mutação desse gene (Reich et al., 2016; Ahmed et al., 2000). Enfatizando esses dados, pesquisas mostraram que a expressão de IGLC1 é um potencial marcador de tumores testiculares (Cools et al., 2006), neoplasias urológicas e câncer colorretal (Disciglio et al., 2016). Por último, destaca-se a presença da Histona H2B no plasma seminal de homens diagnosticados com varicocele e azoospermia. Esta proteína é exclusivamente expressa nos espermatócitos

leptótenos durante a espermiogênese (Churikove et al., 2004). Nesta fase, ocorre uma modificação morfológica importante do espermatozóide, levando a condensação da cromatina, pela ligação de proteínas de transição com o núcleo espermático e depois pelas protaminas (Rathche et al., 2014). Portanto, H2B está envolvida na estrutura dos nucleossomos da fibra cromossômica com função na compactação da cromatina e empacotamento do DNA (Wu et al., 2015, Lee et al., 2008, Gineitis et al., 2000). Esta condensação da cromatina durante a espermatogênese permite a preservação do material genético por meio da substituição de histonas somáticas por histonas específicas testiculares (Rathche et al., 2014). Defeitos epigenéticos durante a transição de histona para protamina não apenas causam redução da fertilidade, mas também são potencialmente transmitidos às próximas gerações (Bao et al., 2016). Nossos resultados apresentaram características semelhantes aos achados de Zhang et al. (2006), onde homens inférteis apresentaram alta expressão de histonas H2B. Além disso, a presença de varicocele e obesidade pode levar a alteração de H2B e reduzir os níveis de proteínas de transição (TH2B), comprometendo a espermiogênese (Platts et al., 2007). Neste sentido, sugerimos que mudanças epigenéticas possam ocorrer precocemente durante a transição para protamina nas espermátides em alongamento, polimorfismos com menores quantidades de variantes de H2B, afetando a morfologia e motilidade dos espermatozoides (Ryu et al., 2022, Bao et al., 2016).

O plasma seminal de homens diagnosticados com varicocele e oligoteratozoospermia apresentou expressão abundante das proteínas LOC782966 (*Tubulin alpha*), MSLN (*Mesothelin*) e HEXB (*Beta-N-acetylhexosaminidase*). A peça intermediária dos espermatozoides possui 9 pares de microtúbulos constituídos por dímeros de α e β -tubulinas, que geram polaridade para o movimento flagelar do espermatozóide (Gholami et al., 2018; Kellogg et al., 2016; de Forges et al., 2012). A presença da α -tubulina garante esta motilidade, reação acrossômica e capacitação espermática (Dvorakova et al., 2005). Modificações pós-traducionais podem impactar negativamente nessa função devido a redução da acetilação da α -tubulina que acarreta alterações

na função e estabilidade dos flagelos espermáticos, observado em homens com astenozoospermia (Bhagwat et al., 2014). Segundo Hosseinifar et al. (2014), a tubulina alfa foi altamente expressa no plasma seminal de homens e está relacionada com o aumento da fragmentação do DNA, inflamação e anormalidades seminais, bem como a destruição dos microtúbulos espermáticos. Mesothelin é uma glicoproteína de 40 kDa ligada à superfície celular pela glicosilfosfatilinositol (GPI) que potencializa as vias de sinalização, reconhecimento e adesão celular. A MSLN é bastante expressa no ovário, pâncreas, pulmão e tumores sólidos (câncer de mama), mas pouco expressa no baço, fígado, rim e testículos (Bera et al., 2000). Portanto, pode ser considerada um biomarcador sérico para câncer de pâncreas, peritoneal, leucemia, colorretal, pancreatite, mama, ovário e testículo (Levý et al., 2019). No plasma seminal, a MSLN foi positivamente regulada em homens com pancreatite quando comparado a homens saudáveis (Kagedan et al., 2012). Com base nesses achados, acredita-se que MSLN está relacionada aos processos inflamatórios, como na varicocele. A enzima lisossômica β -N-acetilhexosaminidase (HEXB), presente no grupo VOTZ, tem a função de hidrolisar resíduos terminais de N-acetilgalactosamina ou N-acetilglicosamina das extremidades não redutoras das cadeias de oligossacarídeos de glicoproteínas da zona pelúcida, glicolipídeos e proteoglicanos (Dacheux et al., 2005, Hermo et al., 1997, Hall et al., 1996). A HEXB é expressa nos testículos e em células do epidídimo e, possui a capacidade de modificar os resíduos de N-acetilglicosamina da ZP, bloqueando a polispermia (Hermo et al., 1997), degradar espermatozoides anormais e proteínas celulares (Dacheux et al., 2005). A oligoteratozoospermia é caracterizada por alterações morfológicas nos espermatozoides juntamente com a baixa concentração desses gametas. Nesse sentido, a HEXB em nosso estudo pode estar relacionada a alta degradação dos espermatozoides, refletindo-se na baixa concentração espermática.

Análises *in silico* dos genes que codificam as proteínas identificadas no plasma seminal dos indivíduos objetos deste estudo, indicam significativo enriquecimento da via classificada como degranulação de neutrófilo. O processo de fertilização natural ou artificial induz

uma infiltração transitória de neutrófilos e macrófagos nos tecidos cervicais e uterinos, alguns dos quais migram através do epitélio para o lúmen (Scott et al., 2009). Após o coito, uma profunda leucocitose pró-inflamatória se desenvolve dentro do útero e colo do útero. Acredita-se, então, que as células invasoras, que são predominantemente neutrófilos, fagocitam os espermatozoides não destinados a participar da fertilização (Fiona et al., 1999). Esta resposta inflamatória ocorre na maioria dos mamíferos, sendo considerada necessária para o desenvolvimento da imunotolerância materna durante a gravidez (Robertson, 2005; Barratt et al., 1990). Nesse sentido, o processo de degranulação de neutrófilos é necessário para combater infecções, mas também pode contribuir para a inflamação e o dano tecidual em certas condições (Kolaczowska e Kubes, 2013). Nossos resultados mostraram que as proteínas identificadas nas amostras de plasma seminal dos homens dos grupos varicocele e astenozoospermia e oligoteratozoospermia apresentaram associações também com enriquecimento da via do ciclo de chaperonas HSP90. A expressão inadequada do HSP90 ocasionada pelo estresse térmico nos testículos altera sua ligação com os receptores de esteróides que têm atividade e estabilidade dependente diretamente da HSP90 (Backe et al., 2022). A inibição da ligação HSP90-esteroides compromete a fertilidade do homem (Crawford et al., 2018), motilidade espermática e metabolismo de ATP (Schulze et al., 2016), além de ocasionar aumento do estresse oxidativo (Prodromou e Bioklund, 2022). Condições de estresse térmico em virtude do sobrepeso e obesidade, bem como o aumento da pressão venosa em virtude da varicocele e estresse oxidativo podem estar associadas às alterações na expressão de *heat shock proteins*, prejudicando as células germinativas (Kang et al., 2022, Ritchie e Ko, 2021, Agawal et al., 2015b, Moura et al., 2011, Jensen et al., 2017, Gat et al., 2005). Em todos os grupos, observou-se a presença da via hemostática considerada de extrema importância para a sobrevivência da espécie humana. A coagulação e liquefação do sêmen são etapas críticas que culminam na reação acrossômica, reconhecimento espermatozoide-óvulo e fertilização. Alterações na expressão de proteínas hemostáticas podem predispor à infertilidade pelas alterações, por exemplo, das

interações entre as proteínas do sistema semenogelinas (SEMG) e o antígeno prostático específico (PSA), que degrada a SEMG, regulando a motilidade espermática e capacitação. Além disso, a quantidade de lipídeos, inibidores da proteína C, fatores de ativação e inibidores do plasminogênio presentes no plasma seminal oriundos da próstata e vesícula seminal que medeiam a liquefação do coágulo seminal são mecanismos hemostáticos de liberação do espermatozoide (Bashir e Alan, 2007).

Devido ao seu potencial como alvos terapêuticos e biomarcadores, a pesquisa sobre miRNAs tem crescido significativamente nas últimas décadas. Os miRNAs são pequenas moléculas de RNA não codificantes que desempenham um papel crucial na regulação gênica, regulando diversos processos biológicos, como desenvolvimento embrionário, diferenciação celular, proliferação celular, morte celular programada (apoptose) e resposta aos estresses celulares (Kyrgiagini et al., 2022). Nesse sentido, usando ferramentas de bioinformática identificamos os miRNA envolvidos na regulação dos principais genes codificantes de proteínas identificadas no plasma seminal dos homens diagnosticados com diferentes *status* de fertilidade. Em todos os grupos, exceto nos homens com varicocele e oligoteratozoospermia, identificou-se o hsa-mir-34a-5p associado a diferentes vias. Em células de mamíferos, a família has-miR-34 é codificada por dois genes diferentes: hsa-miR-34 (a), codificado por seu próprio transcrito, enquanto hsa-miR-34b-3p e hsa-miR-34c-5p compartilham um transcrito primário comum localizado no cromossomo 11q23.1. Os hsa-miR-34a,b,c têm um papel importante na oogênese e espermatogênese (Rotondo et al., 2013) e no desenvolvimento inicial do embrião (Zhu et al., 2008) de modelos animais. Momeni et al. (2020) observaram uma maior regulação negativa dos miRNAs estudados em homens oligoteratoastenozoospermicos, quando comparados aos homens com astenozoospermia, teratozoospermia e astenoteratozoospermia. Esses resultados reforçam que a espermatogênese é fortemente dependente dos processos regulatórios pós-transcricionais.

Conclusão

Em conclusão, nosso estudo observou que quase a totalidade (89,5%) dos participantes estavam com sobrepeso e obesidade, demonstrando que o IMC está relacionado a qualidade espermática, incluindo diminuição na concentração espermática ou na contagem total de espermatozoides, diminuição na motilidade espermática e aumento na porcentagem de anormalidades morfológicas. Além disso, identificamos proteínas que são únicas expressas no proteoma do plasma seminal de homens com parâmetros seminais normais e com varicocele. Em homens com varicocele, essas proteínas estavam relacionadas principalmente com o estresse térmico e oxidativo (HSPA1, MSLN) e inflamatório (IGLC3). Enquanto que em homens com padrões seminais normais, as proteínas únicas estavam envolvidas na capacitação espermática (ANXA3) e combate às espécies reativas de oxigênio (PDX1). Outro achado no presente estudo, foi a abundância das proteínas HEXB no grupo varicocele e oligoteratozoospermia, responsável pela degradação dos espermatozoides defeituosos que afeta na redução das taxas de fertilidade, podendo ser considerado um biomarcador para infertilidade.

Reconhecimento

Este estudo recebeu apoio da Clínica de Reprodução Humana Evangelista Torquato e BIOS - Centro de Medicina Reprodutiva.

Declaração de financiamento

Este estudo recebeu apoio do Laboratório de Fisiologia Animal da Universidade Federal do Ceará, Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos (NPDM) da Universidade Federal do Ceará, CNPq, CAPES, Núcleo de Biologia Experimental (NUBEX) da Universidade de Fortaleza e do Scripps Research Center, na Califórnia, Estados Unidos.

Limitação

Devido ao perfil da clientela atendida na clínica de reprodução humana, o número reduzido de participantes e a baixa adesão à pesquisa se devem ao fato de que todos vivenciavam um momento difícil, causando estresse mental e emocional. Tal situação pode levar ao constrangimento e resistência ao aceite da pesquisa em virtude do impacto do tratamento reprodutivo na vida do casal.

Contribuições dos autores

Luana Mara Cunha, Denise Guerreiro, Arlindo Moura e Evangelista Torquato conceberam a ideia central do estudo. Luana Mara Cunha, Messilyana Mesquita, Alexandre Danton e Ana Filomena Daltro ajudaram na coleta dos dados e informações. Ana Cristina de Oliveira, Carla Soraya Maia, Ana Paula Rodrigues, Denise Guerreiro e Arlindo Moura revisaram e fizeram contribuições científicas. Todos os autores contribuíram com o manuscrito e concordaram com o design final.

Conflito de interesse

Os autores declaram que não existe nenhum conflito de interesse.

Referências

ABESO (2016). Associação Brasileira para o Estudo da Obesidade e da Síndrome Metabólica Diretrizes brasileiras de obesidade 2016 / ABESO - **Associação Brasileira para o Estudo da Obesidade e da Síndrome Metabólica**. – 4.ed. - São Paulo, SP.

Agarwal A, Hamada A, Esteves SC. (2012). **Insight into oxidative stress in varicocele-associated male infertility: part 1**. Nat Rev Urol. 9 (12), pp.678-90. doi: 10.1038/nrurol.2012.197.

Agarwal A, Sharma R, Durairajanayagam D, Ayaz A, Cui Z, Willard B, Gopalan B, Sabanegh E. (2015a). **Major protein alterations in spermatozoa from infertile men with unilateral varicocele**. Reprod Biol Endocrinol. 13 (8), pp. 1-22. doi: 10.1186/s12958-015-0007-2.

Agarwal P, Daher AM, Agarwal R. (2015b). **Aqueous humor TGF- β 2 levels in patients with open-angle glaucoma: A meta-analysis.** Mol. Vis. 25 (21), pp. 612–620. PMID: 26019480; PMCID: PMC4445076.

Agarwal A, Parekh N, Panner Selvam MK, Henkel R, Shah R, Homa ST, Ramasamy R, Ko E, Tremellen K, Esteves S, Majzoub A. et al. (2019). **Male Oxidative Stress Infertility (MOSI): Proposed Terminology and Clinical Practice Guidelines for Management of Idiopathic Male Infertility.** World J Mens Health. 37 (3), pp. 296-312. doi: 10.5534/wjmh.190055.

Agarwal A, Baskaran S, Parekh N, Cho CL, Henkel R, Vij S, Arafa M, Panner Selvam MK, Shah R. (2021). **Male infertility.** Lancet. 397 (397), pp.319-333. doi: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)32667-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)32667-2).

Agarwal A, Cannarella R, Saleh R, Boitrelle F, Gül M, Toprak T, Salvio G, Arafa M, Russo GI, Harraz AM, et al. (2023) **Impact of Varicocele Repair on Semen Parameters in Infertile Men: A Systematic Review and Meta-Analysis.** World J Mens Health. 41 (2), pp. 289-310. doi: 10.5534/wjmh.220142.

Ahmed SF, Cheng A, Dovey L, Hawkins JR, Martin H, Rowland J, Shimura N, Tait AD, Hughes IA. (2000). **Phenotypic features, androgen receptor binding, and mutational analysis in 278 clinical cases reported as androgen insensitivity syndrome.** J Clin Endocrinol Metab. 85 (2), pp. 658-665. doi: 10.1210/jcem.85.2.6337.

Aitken RJ, Bromfield EG, Gibb Z. (2022). **Oxidative stress and reproductive function: The impact of oxidative stress on reproduction: a focus on gametogenesis and fertilization.** Reproduction. 164 (6), pp. F79-F94. doi: 10.1530/REP-22-0126.

- Alshahrani S, Ahmed AF, Gabr AH, Abalhassan M, Ahmad G. (2016). **The impact of body mass index on semen parameters in infertile men.** *Andrologia*. 48 (10), pp. 1125-1129. doi: 10.1111/and.12549.
- Bao J, Bedford MT. (2016) **Epigenetic regulation of the histone-to-protamine transition during spermiogenesis.** *Reproduction*. 151(5), pp. R55-70. doi: 10.1530/REP-15-0562.
- Barratt CLR, Bolton AE, Cooke ID. (1990). **Functional significance of white blood cells in the male and female reproductive tract.** *Hum. Reprod.* 5 (6), pp. 639–648. doi: <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.humrep.a137162>.
- Bashir AL & Alan JC. (2007). **Role of Seminal Hemostatic Factors and Semenogelins in the Reproductive.** *Tract Semin Thromb Hemost*. 33 (1), pp.001-002
doi: 10.1055/s-2006-959280.
- Baskaran S, Finelli R, Agarwal A, Henkel R. (2021). **Reactive oxygen species in male reproduction: A boon or a bane?** *Andrologia*. 53 (1), pp.e13577. doi: 10.1111/and.13577.
- Baskaran S, Panner Selvam MK, Agarwal A. (2020). **Exosomes of male reproduction.** *Adv Clin Chem*. 95, pp. 149-163. doi: 10.1016/bs.acc.2019.08.004.
- Backe, SJ, Sager, RA, Regan, BR, Sit, J., Major, LA, Bratslavsky, G., Woodford, MR, Bourboulia, D., & Mollapour, M. (2022). **A specialized Hsp90 co-chaperone network regulates steroid hormone receptor response to ligand.** *Cell reports*,12 (40), pp. 1-31. doi: <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2022.111039>.
- Bera TK & Pastan I. (2000). **Mesothelin is not required for normal mouse development or reproduction.** *Mol Cell Biol*. 20 (8), pp. 2902-6. doi: 10.1128/MCB.20.8.2902-2906.2000.

Bieniek, JM., Lo, KC. (2016). **Recent advances in understanding & managing male infertility**. F1000Research, 5, 2756. doi: <https://doi.org/10.12688/f1000research.9375.1>.

Bieniek JM, Kashanian JA, Deibert CM, Grober ED, Lo KC, Brannigan RE, Sandlow JI, Jarvi KA. (2016). **Influence of increasing body mass index on semen and reproductive hormonal parameters in a multi-institutional cohort of subfertile men**. Fertil Steril. 106 (5), pp. 1070-1075. doi: 10.1016/j.fertnstert.2016.06.041.

Bojarová P, Bruthans J, Křen V. (2019). **β -N-Acetylhexosaminidases-the wizards of glycosylation**. Appl Microbiol Biotechnol. 103 (19), pp. 7869-7881. doi: 10.1007/s00253-019-10065-0.

Burgoyne, R.D. & Geisow, M.J. (1989). **The annexin family of calcium-binding proteins**. Review article. Cell Calcium. 10 (1), pp. 1-10. doi: 10.1016/0143-4160(89)90038-9.

Bhagwat S, Dalvi V, Chandrasekhar D, Matthew T, Acharya K, Gajbhiye R, Kulkarni V, Sonawane S, Ghosalkar M, Parte P. (2014). **Acetylated α -tubulin is reduced in individuals with poor sperm motility**. Fertil Steril. 101 (1), pp: 95-104.e3. doi: 10.1016/j.fertnstert.2013.09.016.

Camargo M, Intasqui LP, Del Giudice PT, Carvalho VM, Cardozo KH, Andreoni C, Fraietta R, Bertolla RP. (2013). **Unbiased label-free quantitative proteomic profiling and enriched proteomic pathways in seminal plasma of adult men before and after varicocelectomy**. Hum Reprod. 28 (1), pp.33-46. doi: 10.1093/humrep/des357.

Cargnelutti F, Pallotti F, Carlini T, Faja F, Vestri AR, Fegatelli DA, Lenzi A, Lombardo F, Paoli D. (2023). **A decade of WHO 2010: total sperm number temporal trend and role of lifestyle factors**. Asian J Androl. doi: 10.4103/aja202297.

Coutton C, Escoffier J, Martinez G, Arnoult C, Ray PF. (2015). **Teratozoospermia: spotlight on the main genetic actors in the human.** Hum Reprod Update. 21 (4), pp. 455-85. doi: 10.1093/humupd/dmv020.

Chang SJ, Weng SL, Hsieh JY, Wang TY, Chang, MD, Wang HW. (2011). **MicroRNA-34a modulates genes involved in cellular motility and oxidative phosphorylation in neural precursors derived from human umbilical cord mesenchymal stem cells.** BMC Medical Genomics. 4 (65), pp. 1-8 doi: 10.1186/1755-8794-4-65.

Chemes EH, Rawe YV. (2003). **Sperm pathology: a step beyond descriptive morphology. Origin, characterization and fertility potential of abnormal sperm phenotypes in infertile men.** Hum Reprod Update 9(5) pp. 405– 428. doi: 10.1093/humupd/dmg034.

Cho CL, Esteves SC, Agarwal A. (2016). **Novel insights into the pathophysiology of varicocele and its association with reactive oxygen species and sperm DNA fragmentation.** Asian journal of andrology, 18 (2), pp. 186–193. doi: <https://doi.org/10.4103/1008-682X.170441>.

Christmas P, Callaway J, Fallon J, Jones J, Haigler HT. (1991). **Selective secretion of annexin 1, a protein without a signal sequence, by the human prostate gland.** J Biol Chem.266 (4), pp. 2499-507. PMID: 1824943.

Churikov D, Siino J, Svetlova M, Zhang K, Gineitis A, Morton Bradbury E, Zalensky A. (2004). **Novel human testis-specific histone H2B encoded by the interrupted gene on the X chromosome.** Genomics. 84 (4), pp. 745-56. doi: 10.1016/j.ygeno.2004.06.001. PMID: 15475252.

Cools M, Drop SL, Wolffenbuttel KP, Oosterhuis JW, Looijenga LH. (2006). **Germ cell tumors in the intersex gonad: old paths, new directions, moving frontiers.** *Endocr Rev.* 27 (5), pp. 468-84. doi: 10.1210/er.2006-0005.

Crawford ED, Schellhammer PF, McLeod DG, Moul JW, Higano CS, Shore N, Denis L, Iversen P, Eisenberger MA e Labrie F. (2018). **Androgen receptor targeted treatments of prostate cancer: 35 Years of progress with antiandrogens.** *J. Urol* 200 (5), pp. 956–966. doi: 10.1016/j.juro.2018.04.083.

Dacheux JL, Castella S, Gatti JL, Dacheux F. (2005). **Epididymal cell secretory activities and the role of proteins in boar sperm maturation.** *Theriogenology.* 63 (2), pp. 319-41. doi: 10.1016/j.theriogenology.2004.09.015.

de Forges, H., Bouissou, A., & Perez, F. (2012). **Interplay between microtubule dynamics and intracellular organization.** *The international journal of biochemistry & cell biology*, 44 (2), pp. 266-274. doi: 10.1016/j.biocel.2011.11.009.

de Lamirande, E. (2007). **Semenogelin, the main protein of the human semen coagulum, regulates sperm function.** *Semin Thromb Hemost.* 33 (1), pp. 60-8. doi: 10.1055/s-2006-958463.

de Rooij DG. (2009). The spermatogonial stem cell niche. *Microsc Res Tech* 72, pp. 580–585. doi: <https://doi.org/10.1002/jemt.20699>.

Din SFG, Abougabal K, Saad HM, Mohamed MS, Ali AMM, Sief AA (2022). **Estimation of Serum and Seminal Plasma Levels of Glactin-1 in Non-Obstructive Azoospermia Cases and Their Correlations with the Rate of Sperm Retrieval: A Comparative Prospective Study.** *J Reprod Infertil.* 23 (4), pp. 257-263. doi: 10.18502/jri.v23i4.10810.

- Disciglio V, Devecchi A, Palumbo O, Carella M, Penso D, Milione M, Valle G, Pierotti MA, Vitellaro M, Bertario L, Canevari S, Signoroni S, De Cecco L. (2016). **Whole exome sequencing and single nucleotide polymorphism array analyses to identify germline alterations in genes associated with testosterone metabolism in a patient with androgen insensitivity syndrome and early-onset colorectal cancer.** Chin J Cancer. 35 (1),pp. 51. doi: 10.1186/s40880-016-0115-1.
- Domagala A, Pulido S, Kamieniczna M, Kurpisz M, Herr JC. (2011). **An isoimmune response to human sperm clathrin in an infertile woman with systemic lupus erythematosus.** J Reprod Immunol. 89 (1), pp. 95-102. doi: 10.1016/j.jri.2011.01.015.
- Dvorakova K, Moore HD, Sebkova N, Palecek J. (2005). **Cytoskeleton localization in the sperm head prior to fertilization.** Reproduction, 30 (1), pp. :61–69. doi: 10.1530/rep.1.00549.
- Eisenberg ML, Kim S, Chen Z, Sundaram R, Schisterman EF, Louis GMB. (2014). **The relationship between male BMI and waist circumference on semen quality: data from the LIFE study.** Human Reproduction, 29, (2), pp.193–200. doi:10.1093/humrep/det428.
- Elias AK, Scanlon D, Musgrave IF, Carver JA. (2014). **SEVI, the semen enhancer of HIV infection along with fragments from its central region, form amyloid fibrils that are toxic to neuronal cells.** Biochim Biophys, 1844 (9), pp. 1591-8. doi: 10.1016/j.bbapap.2014.06.006.
- Fainberg J, Kashanian JA. (2019). **Recent advances in understanding and managing male infertility.** F1000Res. 16 (8), pp.F1000 Faculty Rev-670. doi: 10.12688/f1000research.17076.1.
- Félix RC, Anjos L, Costa RA, Letsiou S, Power DM. (2021). **Cartilage Acidic Protein a Novel Therapeutic Factor to Improve Skin Damage Repair?** Mar Drugs. 19 (10), pp. 541. doi: 10.3390/md19100541.

Fraczek M, Wojnar L, Kamieniczna M, Piasecka M, Gill K, Kups M, Chopyak V, Havrylyuk A, Nakonechnyy J, Nakonechnyy A, Wozniak T, Kurpisz M. (2020). **Seminal Plasma Analysis of Oxidative Stress in Different Genitourinary Topographical Regions Involved in Reproductive Tract Disorders Associated with Genital Heat Stress.** *Int J Mol Sci.* 21 (17), pp. 6427. doi: 10.3390/ijms21176427.

Frisancho AR (1990). **Anthropometric standards for the assessment of growth and nutrition status.** The University of Michigan Press: USA.

Gat Y, Zukerman Z, Chakraborty J, Gornish M. (2005). **Varicocele, hypoxia and male infertility. Fluid Mechanics analysis of the impaired testicular venous drainage system.** *Hum Reprod.* 20 (9), pp. 2614-9. doi: 10.1093/humrep/dei089.

Garcia CK, Wilund K, Arca M, Zuliani G, Fellin R, Maioli M, Calandra S, Bertolini S, Cossu F, Grishin N, Barnes R, Cohen JC, Hobbs HH. (2001). **Autosomal recessive hypercholesterolemia caused by mutations in a putative LDL receptor adaptor protein.** *Science.* 2001 292 (5520), pp. 1394-8. doi: 10.1126/science.1060458.

Gholami D, Ghaffari SM, Shahverdi A, Sharafi M, Riazi G, Fathi R. et al. (2018). **Proteomic analysis and microtubule dynamicity of human sperm in electromagnetic cryopreservation.** *Journal of cellular biochemistry,* 119 (11), pp. 9483-9497. doi: 10.1002/jcb.27265.

Gineitis AA, Zalenskaya IA, Yau PM, Bradbury EM, Zalensky AO. (2000). **Human sperm telomere-binding complex involves histone H2B and secures telomere membrane attachment.** *J Cell Biol.* 151 (7), pp. 1591-8. doi: 10.1083/jcb.151.7.1591.

Giojalas LC, Rovasio RA, Fabro G, Gakamsky A, Eisenbach M. (2004). **Timing of sperm capacitation appears to be programmed according to egg availability in the female genital tract.** *Fertil Steril.* 82 (1), pp. 247-9. doi: 10.1016/j.fertnstert.2003.11.046.

Gong S, San Gabriel MC, Zini A, Chan P, O'Flaherty C. (2012). **Low amounts and high thiol oxidation of peroxiredoxins in spermatozoa from infertile men.** J Androl. 33 (6), pp. 1342-51. doi: 10.2164/jandrol.111.016162.

Gomes FP, Park R, Viana AG, Fernandez-Costa C, Topper E, Kaya A. (2020). **Protein signatures of seminal plasma from bulls with contrasting frozen-thawed sperm viability.** Scientific Reports, 10 (14661), pp. 1–14. doi: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-71015-9>.

Gurmukh S, Brooke MW, Alan HBW, Hongyan Xu, Roni JB. (2022). **Serum Free Light Chain Quantification Testing: Comparison of Two Methods for Disease Monitoring.** The Journal of Applied Laboratory Medicine, 7 (6), pp. 1290–1301.
doi: <https://doi.org/10.1093/jalm/jfac068>.

Gurunath S, Pandian Z, Anderson RA, Bhattacharya S. (2011). **Defining infertility a systematic review of prevalence studies.** Hum Reprod Update, 17 (5), pp.575–588. doi: <https://doi.org/10.1093/humupd/dmr015>.

Hall JC, Perez FM, Kochins JG. et al (1996). **Quantification and localization of N-acetyl-beta-D-hexosaminidase in the adult rat testis and epididymis.** Biol Reprod 54 (4), pp. 914–929.
doi: 10.1095/biolreprod54.4.914.

Hosseinfar H, Sabbaghian M, Nasrabadi D, Modarresi T, Dizaj AV, Gourabi H, Gilani MA. (2014). **Study of the effect of varicocelectomy on sperm proteins expression in patients with varicocele and poor sperm quality by using two-dimensional gel electrophoresis.** J Assist Reprod Genet. 31 (6), pp. 725-9. doi: 10.1007/s10815-014-0209-0.

Hosseinzadeh Colagar A, Karimi F, Jorsaraei SG. (2013). **Correlation of sperm parameters with semen lipid peroxidation and total antioxidants levels in astheno- and oligoastheno-**

teratospermic men. Iranian Red Crescent medical journal, 15 (9), pp.780–785. doi:

<https://doi.org/10.5812/ircmj.6409>.

Jensen CFS, Østergren P, Dupree JM, Ohl DA, Sonksen J, Fode M. (2017). **Varicocele and male infertility.** Nat Rev Urol, 14, pp. 523–533. doi: <https://doi.org/10.1038/nrurol.2017.98>.

Kang C, Punjani N, Lee RK, Li OS, Goldstein M. (2022). **Effect of varicoceles on spermatogenesis.** Semin Cell Dev Biol. 121, pp. 114-124. doi: 10.1016/j.semcdb.2021.04.005.

Kellogg EH, Howes S, Ti SC, Ramírez-Aportela E, Kapoor TM, Chacón P, Nogales E. (2016). **Near-atomic cryo-EM structure of PRC1 bound to the microtubule.** Proceedings of the National Academy of Sciences, 113 (34), pp. 9430-9439. doi : 10.1073/pnas.1609903113.

Kolaczowska E & Kubes P. (2013). **Neutrophil recruitment and function in health and inflammation.** Nat Rev Immunol 13, pp.159–175 (2013). <https://doi.org/10.1038/nri3399>.

Khandwala YS, Baker VL, Shaw GM, Stevenson DK, Lu Y, Eisenberg ML. (2018). **Association of paternal age with perinatal outcomes between 2007 and 2016 in the united states: population based cohort study.** BMJ 363:k4372. doi: 10.1136/bmj.k4372.

Kozomara A & Griffiths-Jones S. (2014) **miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data.** Nucleic Acids Research, 42, (Issue D1), 1 pp. D68–D73. doi: <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1181>.

Khodamoradi K, Golan R, Dullea A, Ramasamy R. (2022). **Exosomes as Potential Biomarkers for Erectile Dysfunction, Varicocele, and Testicular Injury.** Sex Med Rev. 10 (2), pp. 311-322. doi: 10.1016/j.sxmr.2021.10.001.

Kruger TF, Acosta AA, Simmons KF, Swanson RJ, Matta JF, Oehninger S. (1988). **Predictive value of abnormal sperm morphology in in vitro fertilization.** *Fertil Steril.* 49 (1), pp. 112-7. doi: 10.1016/s0015-0282(16)59660-5.

Kyrgiafini MA, Sarafidou T, Mamuris Z. (2022). **The Role of Long Noncoding RNAs on Male Infertility: A Systematic Review and In Silico Analysis.** *Biology (Basel).* 11 (10), pp. 1-32. doi: 10.3390/biology11101510. PMID: 36290414; PMCID: PMC9598197.

Laurila R, Parkkila S, Isola J, Kallioniemi A, Alarmo EL. (2013). **The expression patterns of gremlin 1 and noggin in normal adult and tumor tissues.** *Int J Clin Exp Pathol.* 6 (7), pp. 1400-8. PMID: 23826422. PMCID: PMC3693206.

Leathersich S & Hart R.J. (2022). **Immune infertility in men.** *Fertil Steril.* 117 (6), pp. 1121-1131. doi: 10.1016/j.fertnstert.2022.02.010.

Lee J, Kitajima TS, Tanno Y, Yoshida K, Morita T, Miyano T, Miyake M, Watanabe Y. (2008). **Unified mode of centromeric protection by shugoshin in mammalian oocytes and somatic cells.** *Nat Cell Biol.* 10 (1), pp. 42-52. doi: 10.1038/ncb1667.

Leslie SW, Soon-Sutton TL, Khan MAB. (2023). **Male Infertility.** In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jan—. PMID: 32965929.

Levý M, Boublíková L, Büchler T, Šimša J. (2019). **Treatment of Malignant Peritoneal Mesothelioma.** *Klin Onkol.* 32 (5), pp. 333-337. doi: 10.14735/amko2019333.

Li J, Liu H, Zou L, Ke J, Zhang Y, Zhu Y, Yang Y, Gong Y, Tian J, Zou D, Peng X, Gong J, Zhong R, Huang K, Chang J, Miao X. (2017). **A functional variant in GREM1 confers risk for colorectal cancer by disrupting a hsa-miR-185-3p binding site.** *Oncotarget.* 8 (37), pp. 61318-61326. doi: 10.18632/oncotarget.18095.

Liu Y, O'Flaherty C. (2017). ***In vivo* oxidative stress alters thiol redox status of peroxiredoxin 1 and 6 and impairs rat sperm quality**. Asian J Androl. 19 (1), pp. 73-79. doi: 10.4103/1008-682X.170863.

Lotti F, Frizza F, Balercia G, Barbonetti A, Behre HM, Calogero AE, et al. (2020). **The European academy of andrology (EAA) ultrasound study on healthy, fertile men: scrotal ultrasound reference ranges and associations with clinical, seminal, and biochemical characteristics**. Andrology. 8 (5), pp. 1005–1020. doi: 10.1111/andr.12808.

Lu, CM., Lin, JJ., Huang, HH. et al. (2014). **A panel of tumor markers, calreticulin, annexin A2, and annexin A3 in upper tract urothelial carcinoma identified by proteomic and immunological analysis**. BMC Cancer 23 (14), pp.363. doi: <https://doi.org/10.1186/1471-2407-14-363>.

Machtinger R, Laurent LC, Baccarelli AA. (2016). **Extracellular vesicles: roles in gamete maturation, fertilization and embryo implantation**. Hum Reprod Update. 22 (2), pp. 182-93. doi: 10.1093/humupd/dmv055.

McMahon HT & Boucrot E. (2011). **Molecular mechanism and physiological functions of clathrin-mediated endocytosis**. Nat Rev Mol Cell Biol. 12 (8), pp. 517-33. doi: 10.1038/nrm3151.

Mannucci A, Argento FR, Fini E, Coccia ME, Taddei N, Becatti M, Fiorillo C. (2022). **The Impact of Oxidative Stress in Male Infertility**. Front Mol Biosci. 8, pp. 799294. doi: 10.3389/fmolb.2021.799294.

Martínez-Heredia J, de Mateo S, Vidal-Taboada JM, Ballescà JL, Oliva R. (2008). **Identification of proteomic differences in asthenozoospermic sperm samples**. Hum Reprod. 23 (4), pp. 783-91. doi: 10.1093/humrep/den024.

- Mascarenhas MN, Flaxman SR, Boerma T, Vanderpoel S, Stevens GA. (2012). **National, regional, and global trends in infertility prevalence since 1990: a systematic analysis of 277 health surveys.** PLoS Med, 9 (12), <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1001356>.
- Medini R, Bhagya M, Ravindra PV. (2018). **Expression of β -hexosaminidase in the male reproductive system of the lizard, *Eutropis carinata*. (Reptilia, Squamata) (Schneider, 1801).** Cell Tissue Res. 374 (2), pp. 413-421. doi: 10.1007/s00441-018-2874-2.
- Meier F, Beck S, Grassl, N, Lubeck M, Park MA.; Raether, O.; Mann, M. (2015). **Accumulation-Serial Fragmentation (PASEF): Multiplying Sequencing Speed and Sensitivity by Synchronized Scans in a Trapped Ion Mobility Device.** Journal of proteome research. 14 (12), pp. 5378-5387. doi: 10.1021/acs.jproteome.5b00932.
- Meier F, Brunner AD, Koch S, Koch H, Lubeck M, Krause M, Goedecke N, Decker J, Kosinski T, Park MA, Bache N, Hoerning O, Cox J, Rather O, Mann M. (2018). **Online Parallel Accumulation-Serial Fragmentation (PASEF) with a Novel Trapped Ion Mobility Mass Spectrometer.** Mol Cell Proteomics. 17 (12), pp.2534-2545. doi: 10.1074/mcp.TIR118.000900.
- Michaud A, Lang E. (2017). **Valsalva maneuver for lifting legs to treat supraventricular tachycardias** CJEM. 19 (3), pp. 235-7. doi: 10.1017 / cem.2016.341.
- Mitchell M, Bakos HW, Lane M. (2011). **Paternal diet-induced obesity impairs embryo development and implantation in the mouse.** Fertil Steril 95, pp. 1349–1353.
- Momeni A, Najafipour R, Hamta A, Jahani S, Moghbelinejad S. (2020). **Expression and Methylation Pattern of hsa-miR-34 Family in Sperm Samples of Infertile Men.** Reprod Sci. 27 (1), pp. 301-308. doi: 10.1007/s43032-019-00025-4.

Moura AA, Chapman DA, Koc H, Killian GJ. (2007). **A comprehensive proteomic analysis of the accessory sex gland fluid from mature Holstein bulls.** Anim Reprod Sci. 98 (3-4), pp.169-88. doi: 10.1016/j.anireprosci.2006.03.012. Epub 2006 May 19. PMID: 16713141.

Moura AA, Andrade CR, Souza CEA, Rêgo, JPA, Martins JAM, Oliveira EBS. (2011). **Proteínas do plasma seminal, funções espermáticas e marcadores moleculares da fertilidade.** Rev. Bras. Reprod. Anim, 35 (2), pp.139-144, 2011. <http://www.cbpa.org.br/>.

Mullen, L., Hanschmann, E. M., Lillig, C. H., Herzenberg, L. A., & Ghezzi, P. (2015). **Cysteine Oxidation Targets Peroxiredoxins 1 and 2 for Exosomal Release through a Novel Mechanism of Redox-Dependent.** Secretion. Molecular medicine (Cambridge, Mass.), 21(1), 98–108. <https://doi.org/10.2119/molmed.2015.00033>.

Münch J, Rücker E, Ständker L, Adermann K, Goffinet C, Schindler M, Wildum S, et al. (2007). **As fibrilas amiloides derivadas do sêmen aumentam drasticamente a infecção pelo HIV.** Cella 131(6), pp. 1059 – 71. doi: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.10.014>.

Nowicka-Bauer K, Malcher A, Włoczkowska O, Kamieniczna M, Olszewska M, Kurpisz MK. (2022). **Evaluation of seminal plasma HSPA2 protein as a biomarker of human spermatogenesis status.** Reprod Biol. 22 (1), pp.:100597. doi: 10.1016/j.repbio.2021.100597.

Palmer NO, Bakos HW, Fullston T, Lane M. (2012). **Impact of obesity on male fertility, sperm function and molecular composition.** Spermatogenesis 2 (4), pp.253–263. doi: 10.4161/spmg.2136.

Panner Selvam, M.K., Agarwal, A., Pushparaj, P.N., Baskaran, S., Bendou, H. (2019). **Sperm Proteome Analysis and Identification of Fertility-Associated Biomarkers in Unexplained Male Infertility.** Genes 10, (7), pp. 522. doi: 10.3390/genes10070522.

Panner Selvam MK, Agarwal A, Sharma R, Samanta L, Gupta S, Dias TR, Martins AD. (2020a).

Protein Fingerprinting of Seminal Plasma Reveals Dysregulation of Exosome-Associated Proteins in Infertile Men with Unilateral Varicocele. World J Mens Health. 39 (2), pp. :324-337. doi: 10.5534/wjmh.180108.

Panner Selvam, MK, Ambar, RF, Agarwal, A, Henkel, R. (2020b). **Etiologies of sperm DNA damage and its impact on male infertility.** Andrologia 53 (1), pp. e13706.

Park YJ, Pang MG. (2021). **Mitochondrial Functionality in Male Fertility: From Spermatogenesis to Fertilization.** Antioxidants (Basel). 10 (1), pp. 98. doi: 10.3390/antiox10010098.

Pastuszak, AW & Wang R. (2015). **Varicocele and testicular function.** Asian journal of andrology, 17 (4), pp. 659–667. doi: <https://doi.org/10.4103/1008-682X.153539>.

Pathan M, Keerthikumar S, Ang CS, Gangoda L, Quek CY, Williamson NA, Mouradov D, Sieber OM, Simpson RJ, Salim A, Bacic A., Hill AF, Stroud DA, Ryan MT, Agbinya JI, Mariadason JM, Burgess AW, Mathivanan S. (2015). **FunRich: An open access standalone functional enrichment and interaction network analysis tool.** Proteomics. 15 (15), pp. 2597-601. doi: 10.1002/pmic.201400515.

Picken MM. (2010). **Amyloidosis-where are we now and where are we heading?** Arch Pathol Lab Med. 134 (4), pp. 545-51. doi: 10.5858/134.4.545.

Pini T, Parks J, Russ J, Dzieciatkowska M, Hansen KC, Schoolcraft WB, Katz-Jaffe M. (2020). **Obesity significantly alters the human sperm proteome, with potential implications for fertility.** J Assist Reprod Genet. 37 (4), pp. 777-787. doi: 10.1007/s10815-020-01707-8.

Prodromou C & Bjorklund DM. (2022). **Advances towards Understanding the Mechanism of Action of the Hsp90 Complex**. *Biomolecules*, 12 (5), pp.1-23. doi:

<https://doi.org/10.3390/biom12050600>.

Rathke C, Baarends WM, Awe S, Renkawitz-Pohl R. (2014). **Chromatin dynamics during spermiogenesis**. *Biochim Biophys Acta*. 1839 (3), pp. 155-68. doi:

10.1016/j.bbagr.2013.08.004.

Reich M, Dacheva I, Nobl M, Siwy J, Schanstra JP, Mullen W, Koch FH, Kopitz J, Kretz FT, Auffarth GU, Koss MJ. (2016). **Proteomic Analysis of Vitreous Humor in Retinal Vein Occlusion**. *PLoS One*. 11 (6), pp. e0158001. doi: 10.1371/journal.pone.0158001.

Rhee SG, Kang SW, Jeong W, Chang TS, Yang KS, Woo HA. (2005). **Intracellular messenger function of hydrogen peroxide and its regulation by peroxiredoxins**. *Curr Opin Cell Biol*. 17 (2), pp. 183-9. doi: 10.1016/j.ceb.2005.02.004.

Ritchie C & Ko EY. (2021). **Oxidative stress in the pathophysiology of male infertility**.

Andrologia, 53 (1), e13581. doi: <https://doi.org/10.1111/and.13581>.

Robertson SA. (2005). **Seminal plasma and male factor signalling in the female reproductive tract**. *Cell Tissue Res*. 322 (1), pp. 43–52. doi:10.1007/S00441-005-1127-3.

Ross R, Neeland IJ, Yamashita S, Shai I, Seidell J, Magni P, Santos RD, Arsenault B, Cuevas A, Hu FB, et al. (2020). **Waist circumference as a vital sign in clinical practice: a consensus statement from the IAS and ICCR Working Group on Visceral Obesity**. *Nat Rev Endocrinol*. 16 (3), pp. 177–189. doi: 10.1038/s41574-019-0310-7.

Rotondo JC, Selvatici R, Di Domenico M, Marci R, Vesce F, Tognon M, et al. (2013).

Methylation loss at H19 imprinted gene correlates with methylenetetrahydrofolate

reductase gene promoter hypermethylation in semen samples from infertile males.

Epigenetics. 8 (9), pp.990–7.

Ryu DY, Pang WK, Adegoke EO, Rahman MS, Park YJ, Pang MG. (2022). **Abnormal histone replacement following BPA exposure affects spermatogenesis and fertility sequentially.**

Environ Int. 70, pp. 107617. doi: 10.1016/j.envint.2022.107617.

Sahu A, Lambris JD. (2001). **Structure and biology of complement protein C3, a connecting link between innate and acquired immunity.** Immunol Rev 180, pp. 35–48. doi:

10.1034/j.1600-065x.2001.1800103.x.

Salas-Huetos A, Bulló M, Salas-Salvadó J. (2017). **Dietary patterns, foods and nutrients in male fertility parameters and fecundability: a systematic review of observational studies.**

Hum Reprod Update. 2017 Jul 1;23(4):371-389. doi: 10.1093/humupd/dmx006.

Schulze A, Beliu G, Helmerich DA, Schubert J, Pearl LH, Prodromou, C, Neuweiler H. (2016).

Cooperation of local motions in the Hsp90 molecular chaperone ATPase mechanism. Nat.

Chem. Biol. 12, pp. 628–635. doi: <https://doi.org/10.1038/nchembio.2111>.

Seol DW, Joo SH, Kim YH, Song BS, Sim BW, Kim SU, Park S, Wee G, Kim E. (2022). **Sperm hyaluronidase is critical to mammals' fertilization for its ability to disperse cumulus-oocyte complex layer.** Asian J Androl. 24 (4), pp. 411-415. doi: 10.4103/aja202176.

Scott JL, Ketheesan N, Summers PM. (2009). **Spermatozoa and seminal plasma induce a**

greater inflammatory response in the ovine uterus at oestrus than dioestrus. Reprod Fertil Dev. 21 (7), pp. 817-26. doi: 10.1071/RD09012. PMID: 19698286.

Shen H, Fan X, Zhang Z, Xi H, Ji R, Liu Y, Yue M, Li Q, He J. (2019). **Effects of elevated**

ambient temperature and local testicular heating on the expressions of heat shock protein

70 and androgen receptor in boar testes. Acta Histochem. 121 (3), pp. 297-302. doi: 10.1016/j.acthis.2019.01.009.

Schuppe HC, Pilatz A, Hossain H, Diemer T, Wagenlehner F, Weidner W. (2017). **Urogenital Infection as a Risk Factor for Male Infertility.** Dtsch Arztebl Int. 114 (19), pp. 339-346. doi: 10.3238/arztebl.2017.0339.

Sojka DR, Gogler-Piğłowska A, Vydra N, Cortez AJ, Filipczak PT, Krawczyk Z, Scieglinska D. (2019). **Functional redundancy of HSPA1, HSPA2 and other HSPA proteins in non-small cell lung carcinoma (NSCLC); an implication for NSCLC treatment.** 9 (1), pp. 14394. doi: 10.1038/s41598-019-50840-7.

Sopkova J, Raguene-Nicol C, Vincent M, Chevalier A, Lewit-Bentley A, Russo-Marie F, Gallay J. (2002). **Ca(2+) and membrane binding to annexin 3 modulate the structure and dynamics of its N terminus and domain III.** Protein Sci. 11 (7), pp. 1613-25. doi: 10.1110/ps.4230102.

Soleilhavoup C, Tsikis G, Labas V, Harichaux G, Kohnke PL, Dacheux JL, Guérin Y, Gatti JL, de Graaf SP, Druart X. (2014). **Ram seminal plasma proteome and its impact on liquid preservation of spermatozoa.** J Proteomics. 23 (109), pp. 245-60. doi: 10.1016/j.jprot.2014.07.007.

Stepanov A, Usharova, SA, Malsagova KA, Moshetova LK, Turkina KI, Kopylov AT, Kaysheva AL. (2022). **Tear proteome revealed association of S100A family proteins and mesothelin with thrombosis in elderly patients with retinal vein occlusion.** Int J Mol Sci. 23 (23), pp. 14653. doi: 10.3390/ijms232314653.

Sweeney TE, Rozum JS, Desjardins C, Gore RW. (1991). **Microvascular pressure distribution in the hamster testis**. *Am J Physiol.* 260 (5 Pt 2), pp. H1581-9. doi:

10.1152/ajpheart.1991.260.5.H1581.

Takeshima T, Yumura Y, Yasuda K, Sanjo H, Kuroda S, Yamanaka H, Iwasaki A. (2017).

Inverse correlation between reactive oxygen species in unwashed semen and sperm motion parameters as measured by a computer-assisted semen analyzer. *Asian J Androl.* 19 (3), pp.350-354. doi: 10.4103/1008-682X.173933.

Wald G, Punjani N, Hayden R, Feliciano M, Dudley V, Goldstein M. (2021). **Assessing the clinical value of the Kruger strict morphology criteria over the World Health Organization fourth edition criteria**. *FS Rep.* 2 (2), pp. 176-180. doi: 10.1016/j.xfre.2021.04.003.

Wang J, Wang J, Zhang HR, Shi HJ, Ma D, Zhao HX, Lin B, Li RS. (2009). **Proteomic analysis of seminal plasma from asthenozoospermia patients reveals proteins that affect oxidative stress responses and semen quality**. *Asian J Androl.* 11 (4), pp. 484-91. doi:

10.1038/aja.2009.26.

Wang RN, Green J, Wang Z, Deng Y, Qiao M, Peabody M, Zhang Q, Ye J, Yan Z, Denduluri S, Idowu O, Li M, Shen C, Hu A, Haydon RC, Kang R, Mok J, Lee MJ, Luu HL, Shi LL. (2014). **Bone Morphogenetic Protein (BMP) signaling in development and human diseases**. *Genes Dis.* 1 (1), pp. 87-105. doi: 10.1016/j.gendis.2014.07.005.

Wang H, Liu N, Zeng H. (2014). **[Peroxiredoxin I in sperm and reactive oxygen species in seminal plasma in patients with idiopathic asthenozoospermia]**. *Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban.* 39 (8), pp. 842-8. Chinese. doi: 10.3969/j.issn.1672-7347.2014.08.015. PMID: 25202954.

Willforss J, Morrell JM, Resjö S, Hallap T, Padrik P, Siino V, de Koning DJ, Andreasson E, Levander F, Humblot P. (2021). **Stable bull fertility protein markers in seminal plasma.** J Proteomics. v.236, pp. 104135. doi: 10.1016/j.jprot.2021.104135.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) (2000). **Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a World Health Organization Consultation.** Geneva, 2000. 256p.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) (2008). **Waist circumference and waist-hip ratio: report of a WHO expert consultation.** Geneva, 2008.47p.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) (2018). **International Classification of Diseases, 11th Revision (ICD) 2018.**

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) (2021). **Laboratory manual for the examination and processing of human semen. 6th ed.** Geneva, Switzerland: World Health Organization. 292p.

Wu JL, Kang XJ, Guo MS, Mu SM, Zhang ZH. (2015). **Cloning and Functional Analysis of Histones H3 and H4 in Nuclear Shaping during Spermatogenesis of the Chinese Mitten Crab, *Eriocheir sinensis*.** PLoS One. 10 (5), pp. e0126623. doi: 10.1371/journal.pone.0126623.

Wu Y, Kang X, Zheng H, Liu H, Huang Q, Liu J. (2016). **Effect of paternal age on reproductive outcomes of intracytoplasmic sperm injection.** PLoS One. 11:e0149867. doi: 10.1371/journal.pone.0149867.

Wysocki P, Orzolek A, Strzeżek J, Koziorowska-Gilun M, Zasiadczyk Ł, Kordan W. (2015). **The activity of N-acetyl- β -hexosaminidase in boar seminal plasma is linked with semen quality and its suitability for cryopreservation.** Theriogenology. 83 (7), pp. 1194-202. doi: 10.1016/j.theriogenology.2014.12.025.

Zhang X, San GM, Zini A. (2006). **Sperm nuclear histone to protamine ratio in fertile and infertile men: evidence of heterogeneous subpopulations of spermatozoa in the ejaculate.** J Androl. 27 (3), pp. 414-20. doi: 10.2164/jandrol.05171.

Zhang Y, Zhang YL, Feng C, Wu YT, Liu AX, Sheng JZ, Cai J, Huang HF. (2008). **Comparative proteomic analysis of human placenta derived from assisted reproductive technology.** Proteomics. 8 (20), pp. 4344-56. doi: 10.1002/pmic.200800294.

Zhang Y, Zhang W, Wu X, Liu G, Dai Y, Jiang H, Zhang X. (2022). **Effect of varicocele on sperm DNA damage: A systematic review and meta-analysis.** Andrologia. 54 (1), pp. 1-12. doi: 10.1111/and.14275. Epub 2021 Oct 17. PMID: 34658054.

Zhou Y, Zhou B, Pache L, Chang M, Khodabakhshi AH, Tanaseichuk O, Benner C, Chanda SK. (2019). **Metascape provides a biologist-oriented resource for the analysis of systems-level datasets.** Nat Commun. 10 (1), pp. 1523. doi: 10.1038/s41467-019-09234-6.

Zhu J, He F, Hu S, Yu J. (2008). **On the nature of human housekeeping genes.** Trends Genet. 24 (10), pp. 481-484. doi: <https://doi.org/10.1016/j.tig.2008.08.004>.

Zylbersztejn DS, Andreoni C, Del Giudice PT, Spaine DM, Borsari L, Souza, GHMF, Bertolla RP, Fraietta R. (2013). **Proteomic analysis of seminal plasma in adolescents with and without varicocele.** Fertil Steril. 99 (1), pp. 92-8. doi: <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2012.08.048>.

FIGURAS E TABELAS

Figura 5. BMI de homens com diferentes diagnósticos de fertilidade em centro de medicina reprodutiva. As médias foram comparadas através de ANOVA ou teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunnet ($p < 0,05$). NZ: normozoospermia; VAZ: varicocele + astenozoospermia; VTZ: varicocele + teratozoospermia; VOTZ: varicocele + oligoteratozoospermia.

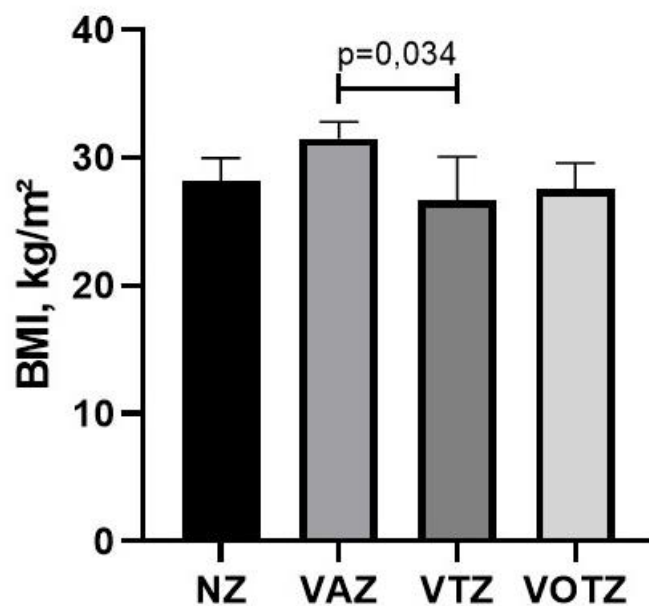


Figura 6. Parâmetros seminais de homens com diferentes diagnósticos de fertilidade em centro de medicina reprodutiva. As médias foram comparadas através de ANOVA ou teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunnet ($p < 0,05$). NZ: normozoospermia; VAZ: varicocele + astenozoospermia; VTZ: varicocele + teratozoospermia; VOTZ: varicocele + oligoteratozoospermia.

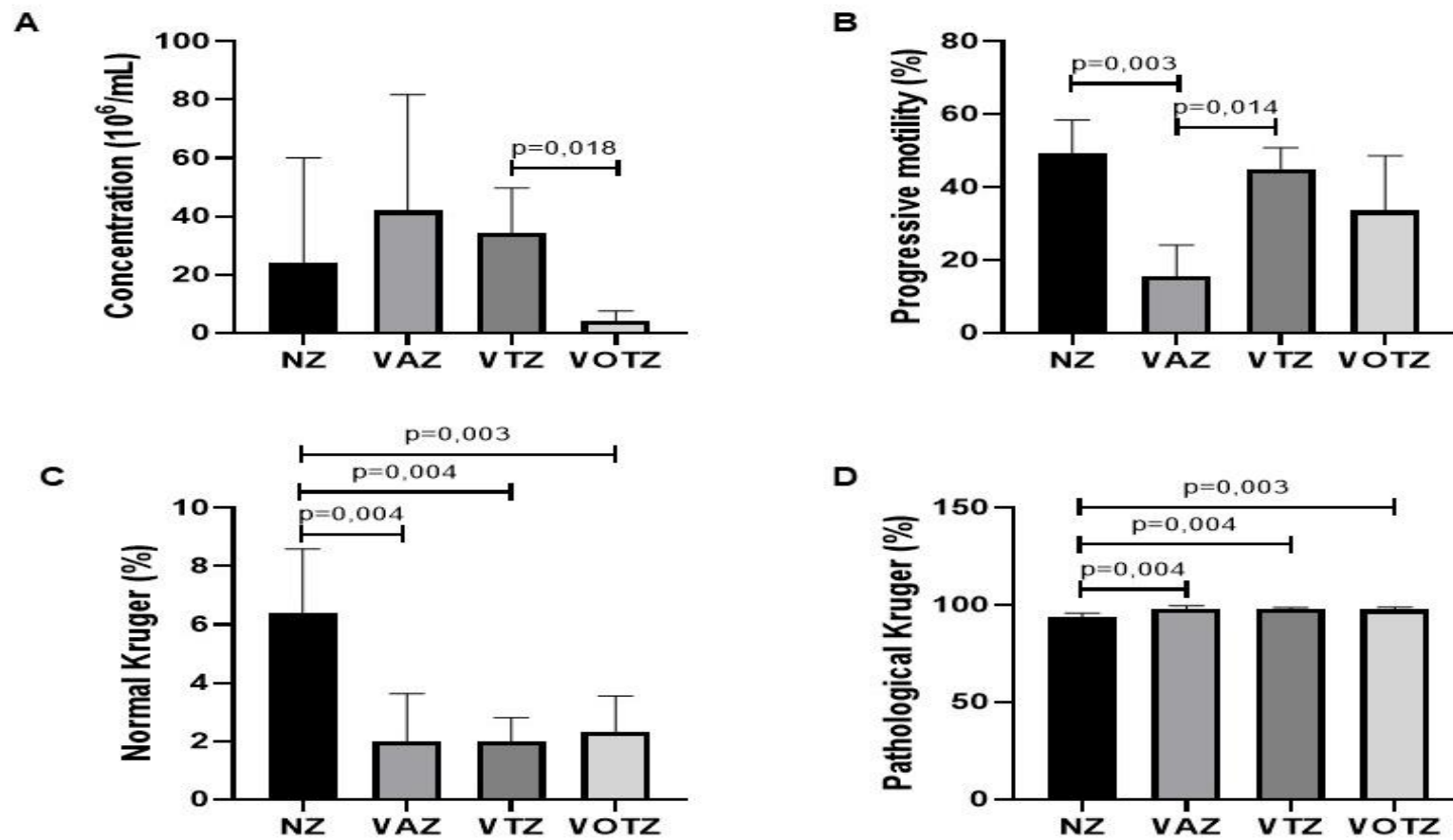


Figura 7. Diagrama de Venn representando os números de proteínas identificadas no plasma seminal de homens com diferentes diagnósticos de fertilidade. NZ: normozoospermia; VAZ: varicocele + astenozoospermia; VTZ: varicocele + teratozoospermia; VOTZ: varicocele + oligoteratozoospermia.

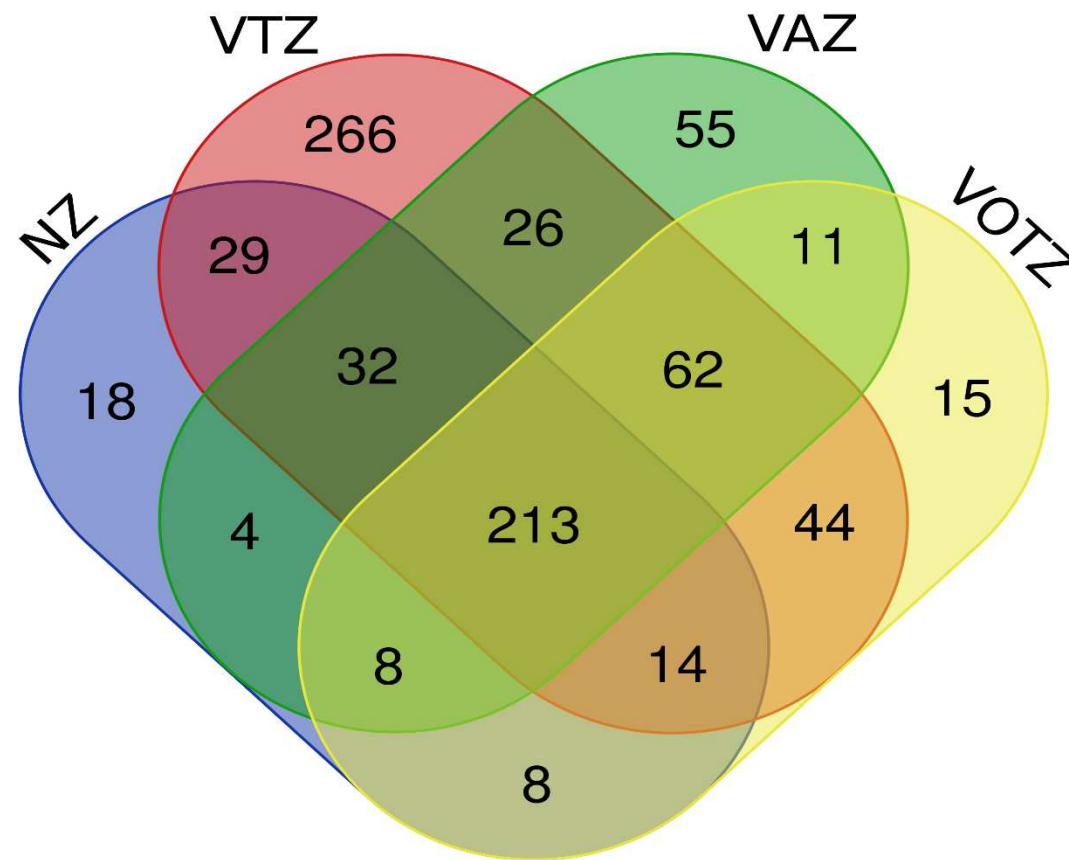
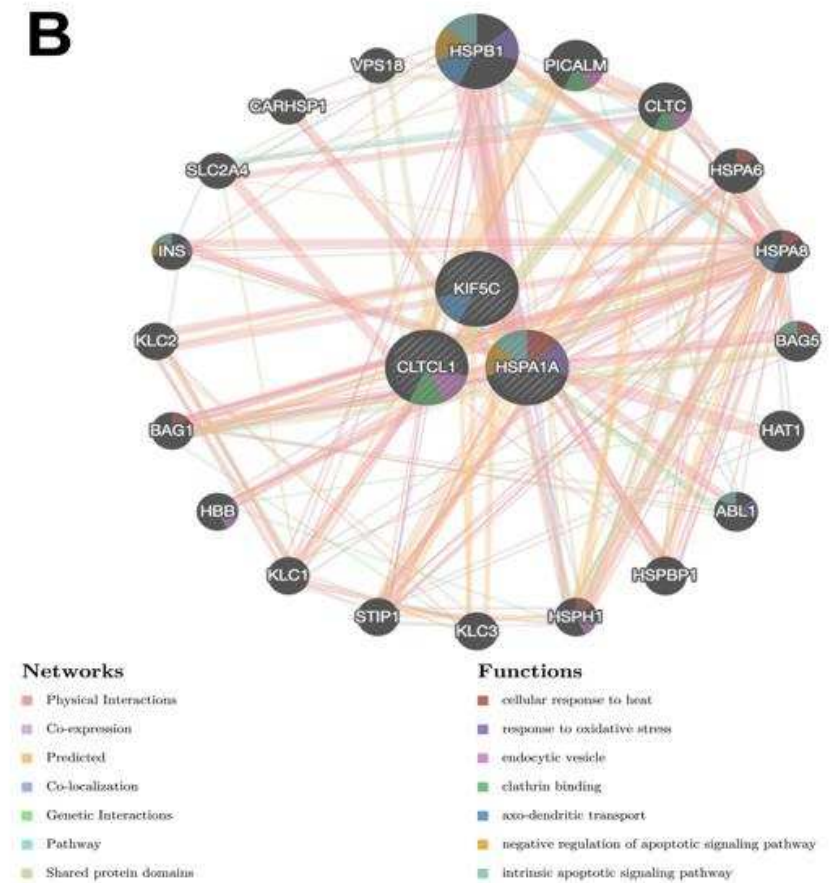
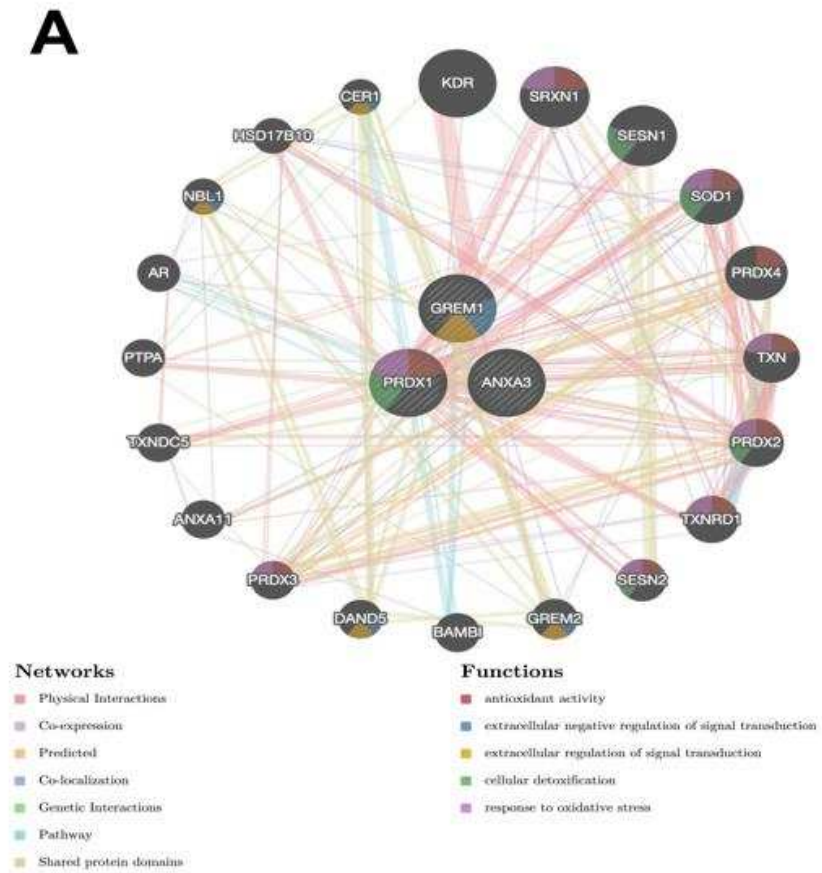
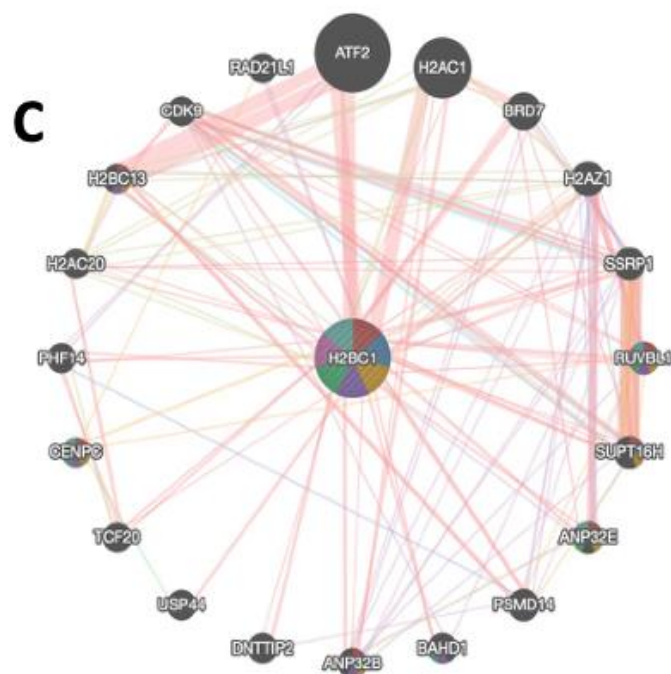


Figura 8. Rede de interação proteína-proteína (GeneMANIA) (A) ANXA3, PRDX1 e CRAC1, (B) HSPA1B, KIF5C e CLTCL1, (C) H2BC1 e (D) MSLN e HEXB.



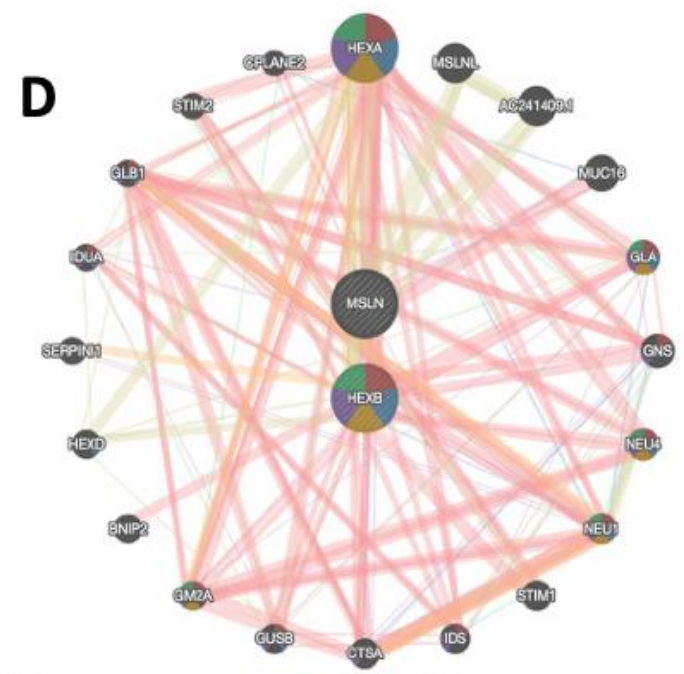


Networks

- Physical Interactions
- Co-expression
- Predicted
- Co-localization
- Genetic Interactions
- Pathway
- Shared protein domains

Functions

- nucleosome organization
- chromatin assembly or disassembly
- protein-DNA complex subunit organization
- DNA packaging
- chromatin remodeling
- DNA conformation change
- ATP-dependent chromatin remodeling



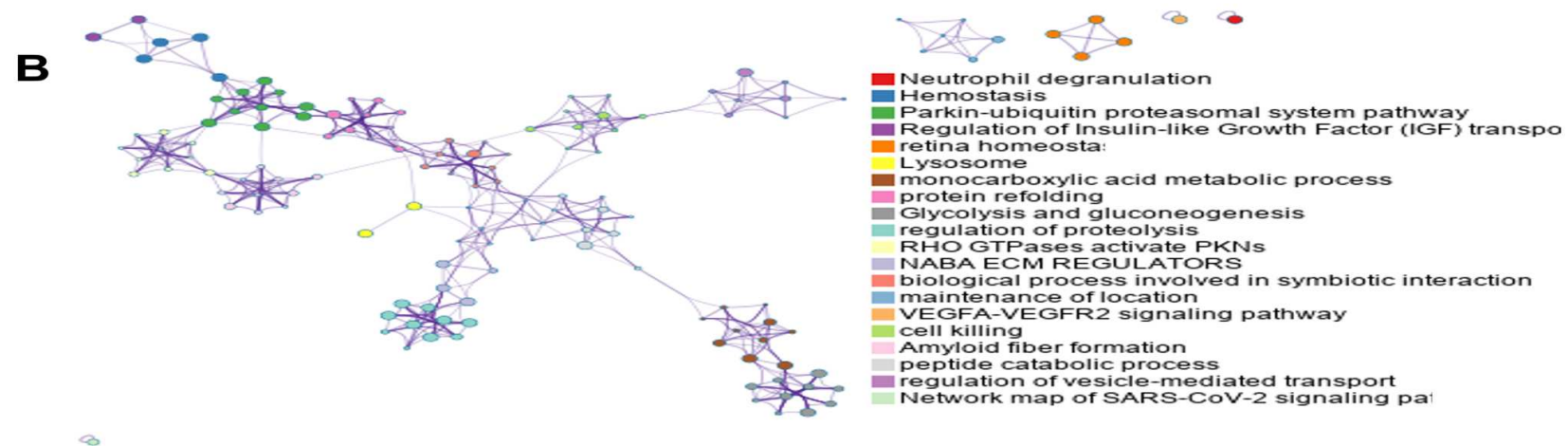
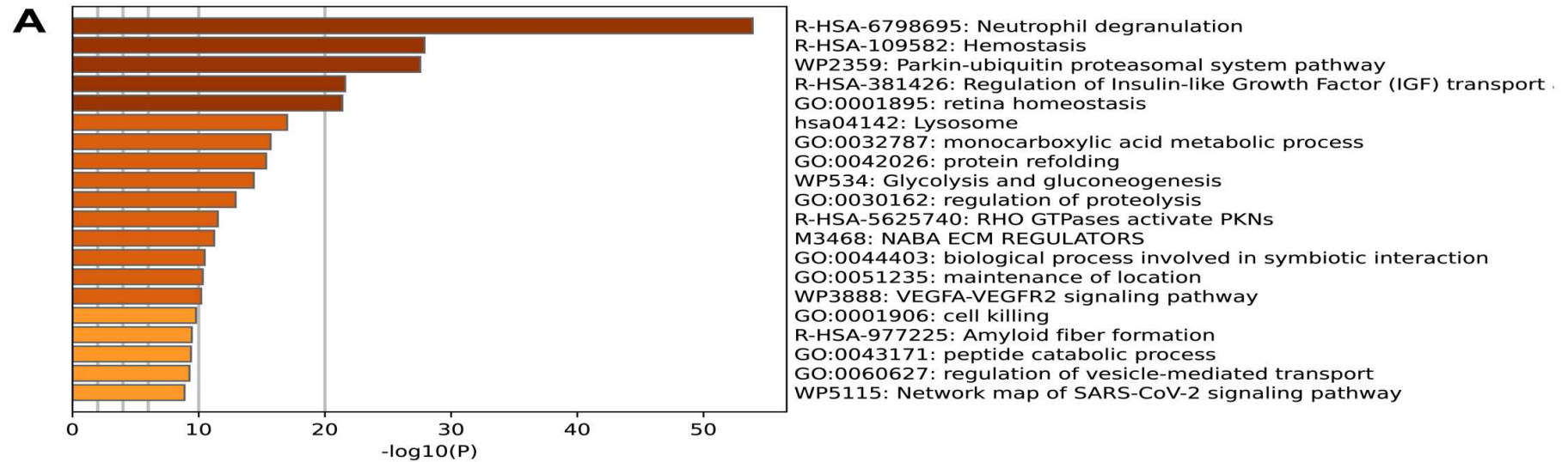
Networks

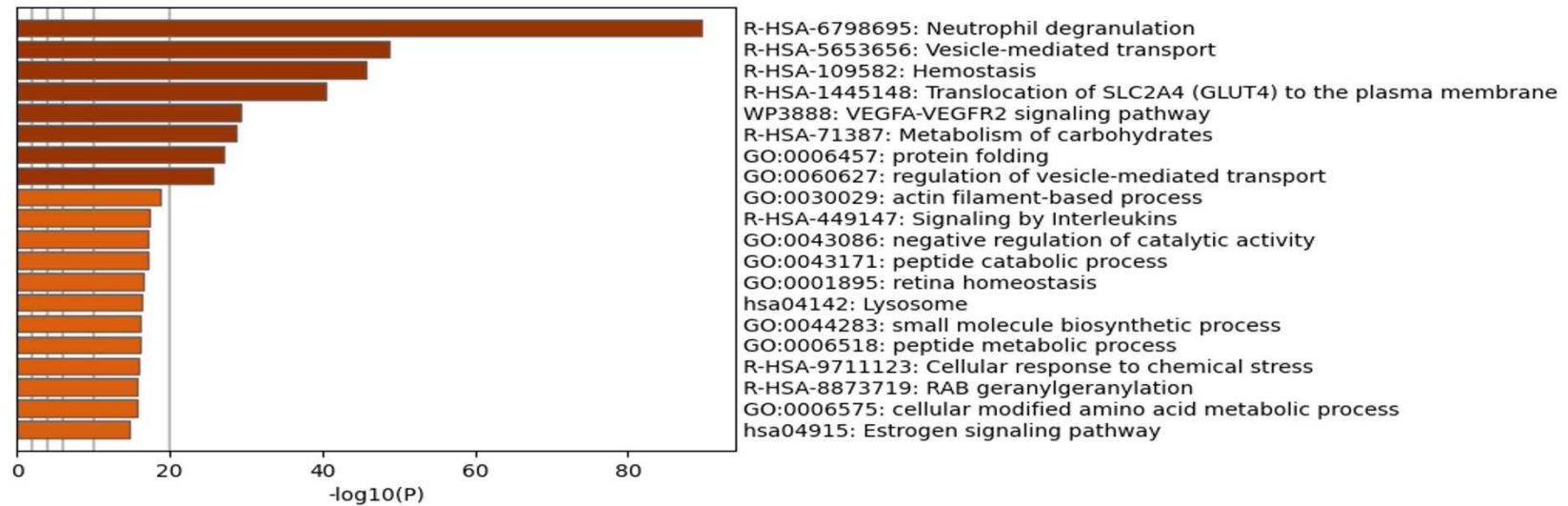
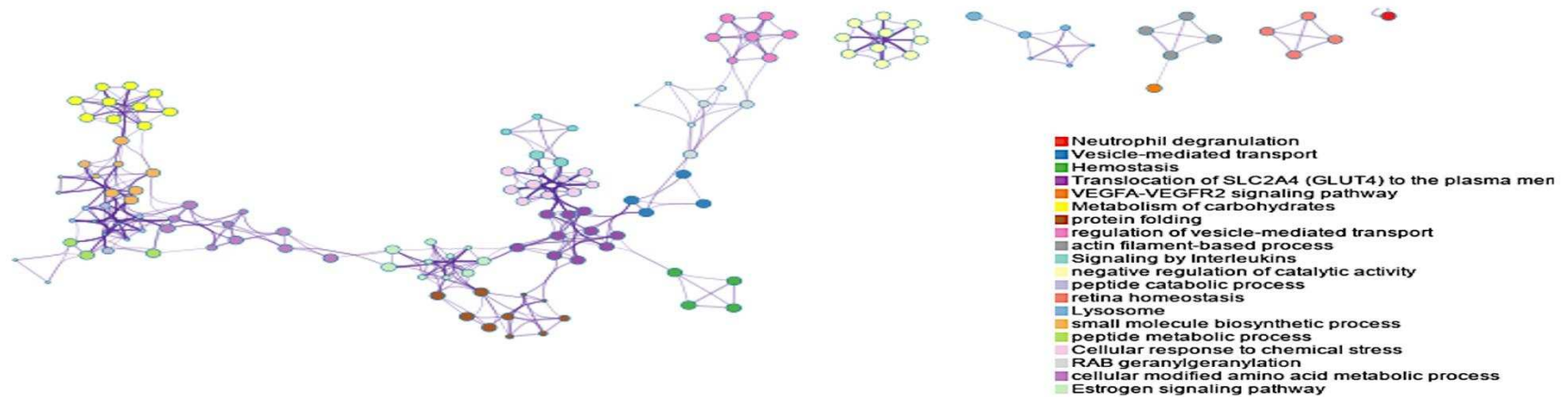
- Physical Interactions
- Co-expression
- Predicted
- Co-localization
- Genetic Interactions
- Pathway
- Shared protein domains

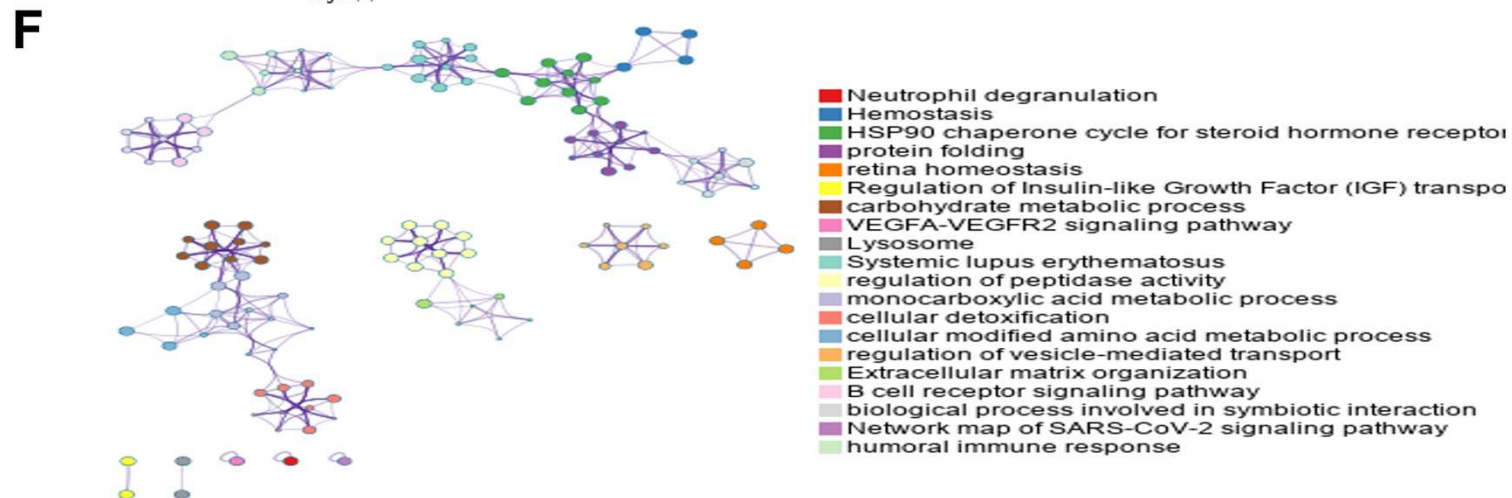
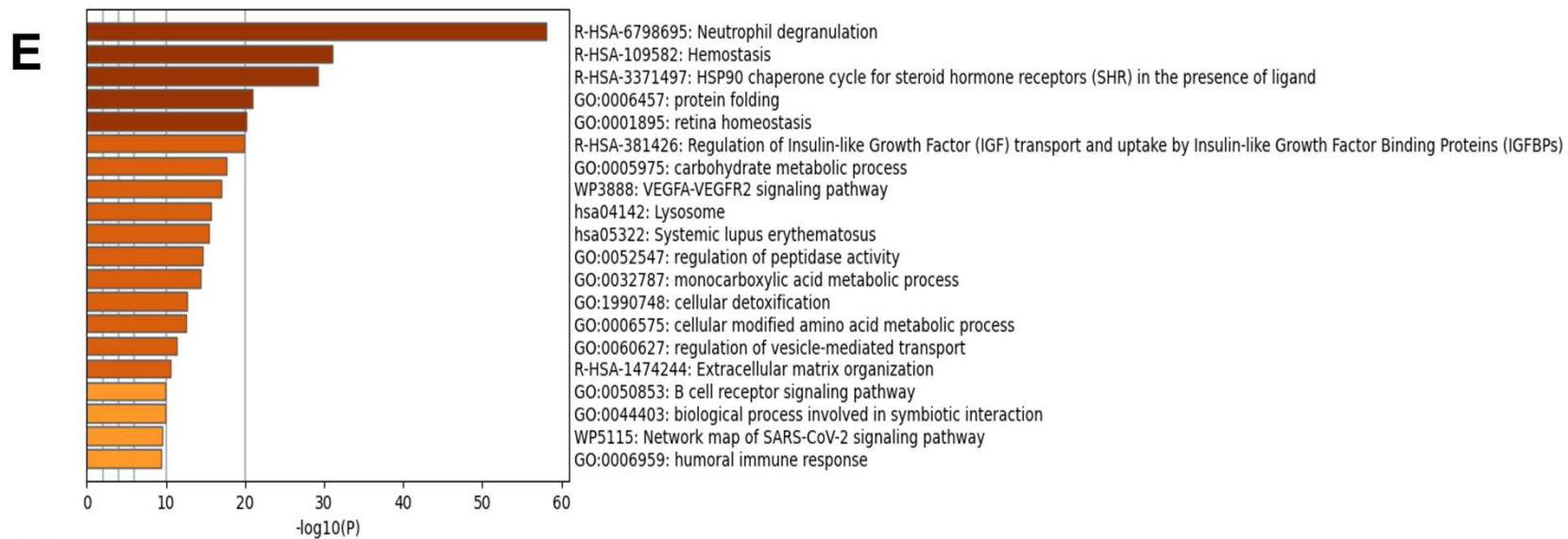
Functions

- carbohydrate derivative catabolic process
- hydrolase activity, hydrolyzing O-glycosyl compounds
- glycolipid catabolic process
- vacuolar lumen
- membrane lipid catabolic process

Figura 9. Grupos funcionais e vias de sinalização associados às proteínas do plasma seminal de homens diferentes diagnósticos de fertilidade. NZ (A e B): normozoospermia; VTZ (C e D): varicocele + teratozoospermia; VAZ (E e F): varicocele + astenozoospermia; VOTZ (G e H): varicocele + oligoteratozoospermia. Análises realizadas através da plataforma Metascape.



C**D**



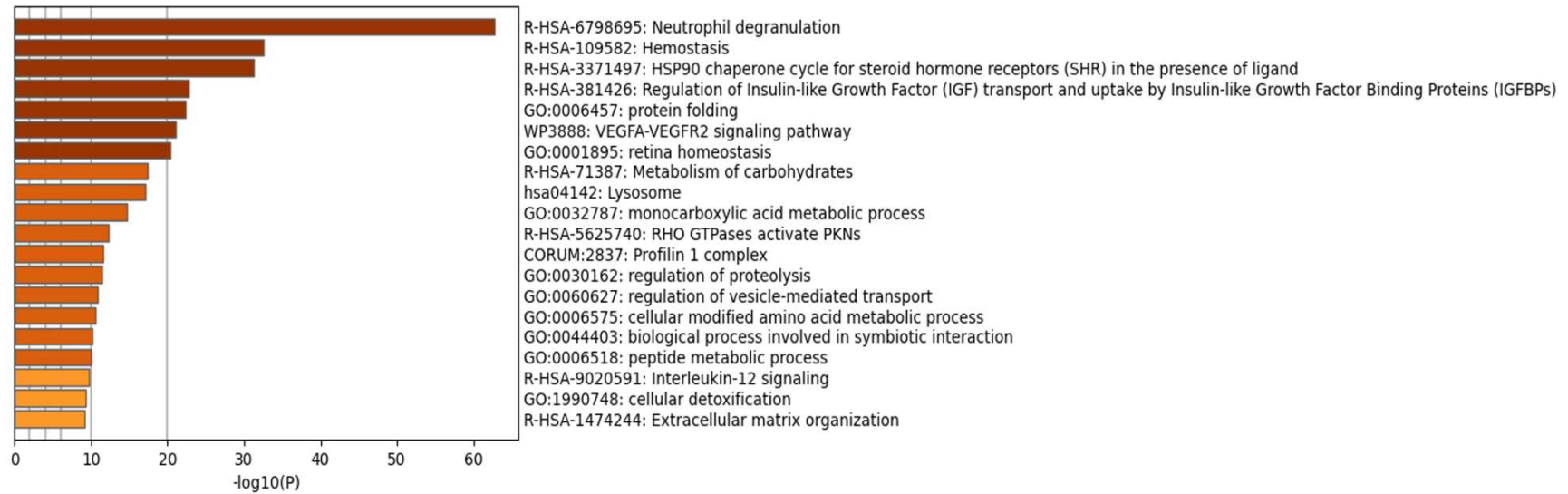
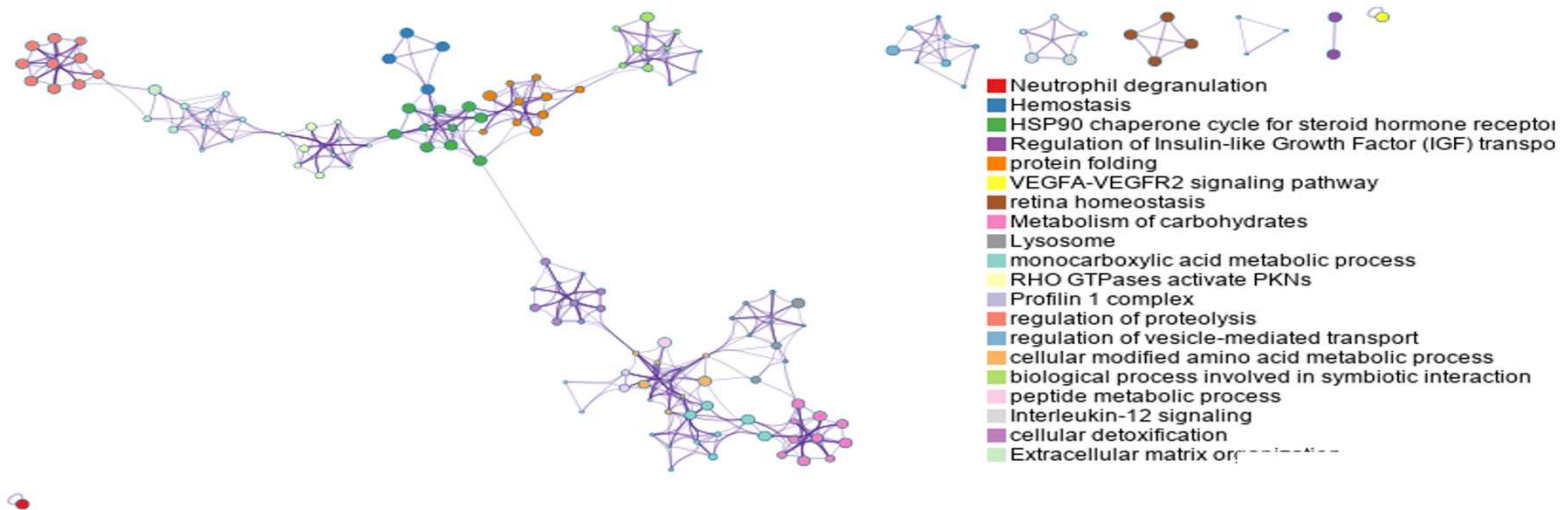
G**H**

Figura 10A. Análise de enriquecimento de rede e conjunto de genes de miRNAs associados à regulação dos genes codificantes das proteínas ANXA3 e PRDX1 identificadas em homens diagnosticados como normozoospermia (NZ). Análises realizadas na plataforma miRNet.

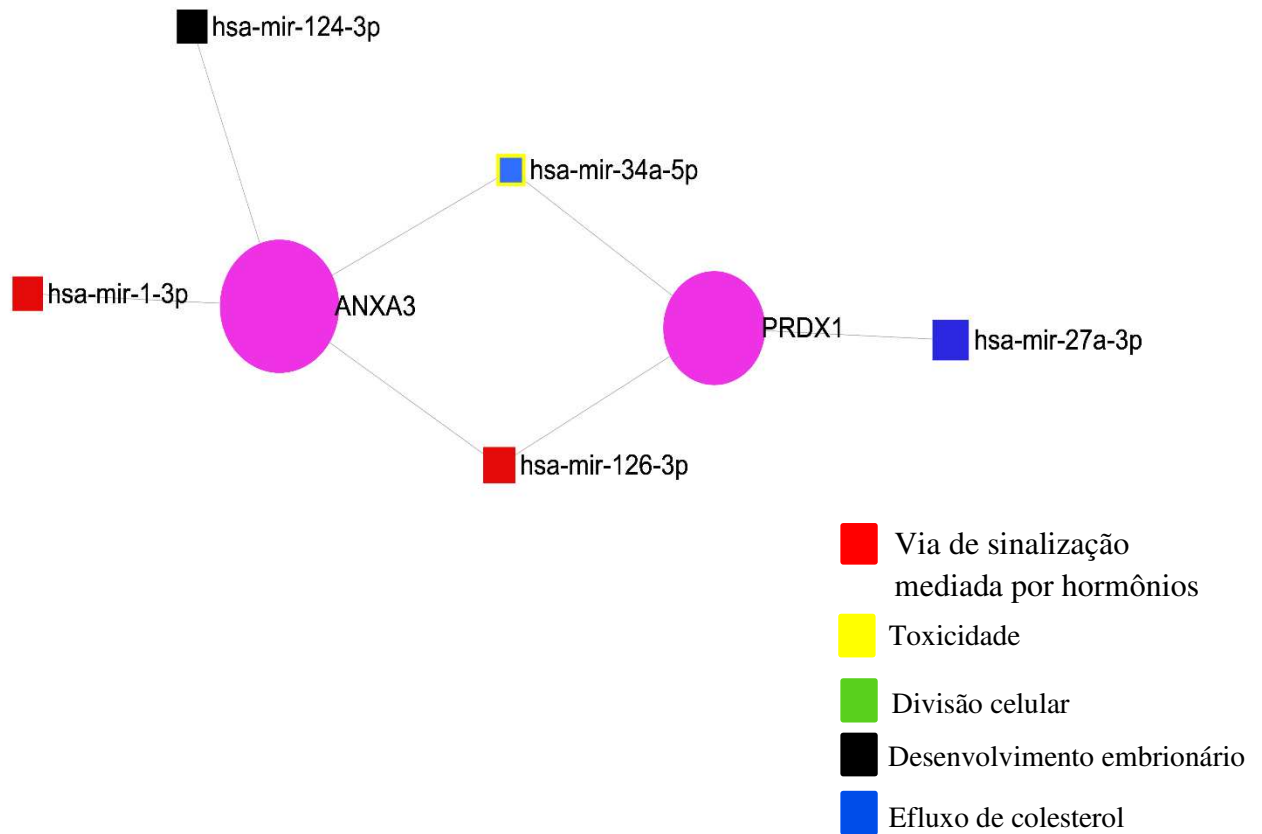


Figura 10B. Análise de enriquecimento de rede e conjunto de genes de miRNAs associados à regulação dos genes codificantes das proteínas KIF5C e HSPA1B identificadas em homens diagnosticados com varicocele + teratozoospermia (VTZ). Análises realizadas na plataforma miRNet.

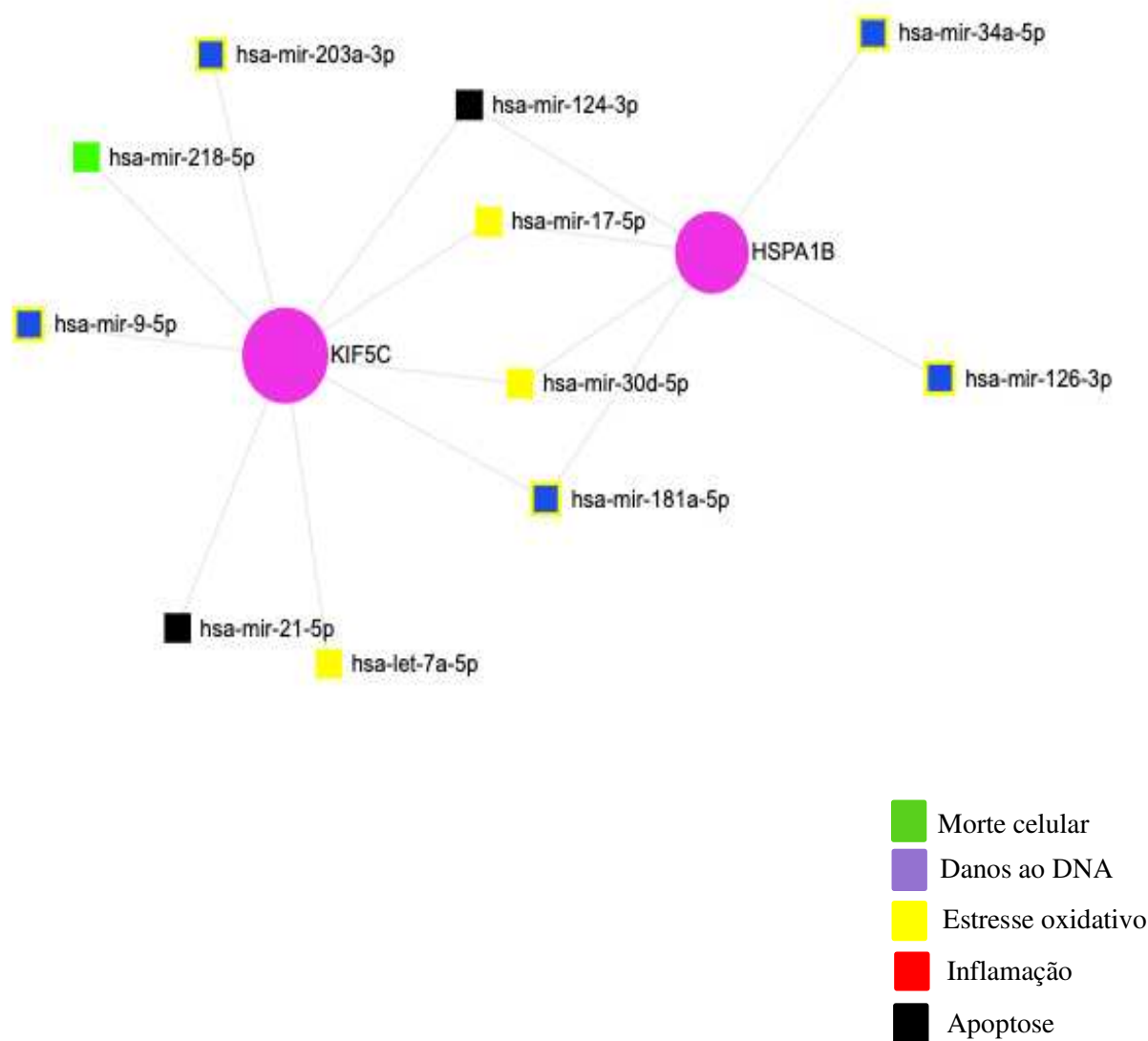


Figura 10C. Análise de enriquecimento de rede e conjunto de genes de miRNAs associados à regulação dos genes codificantes da proteína H2BA (C) identificadas em homens diagnosticados com varicocele + teratozoospermia (VAZ). Análises realizadas na plataforma miRNet.

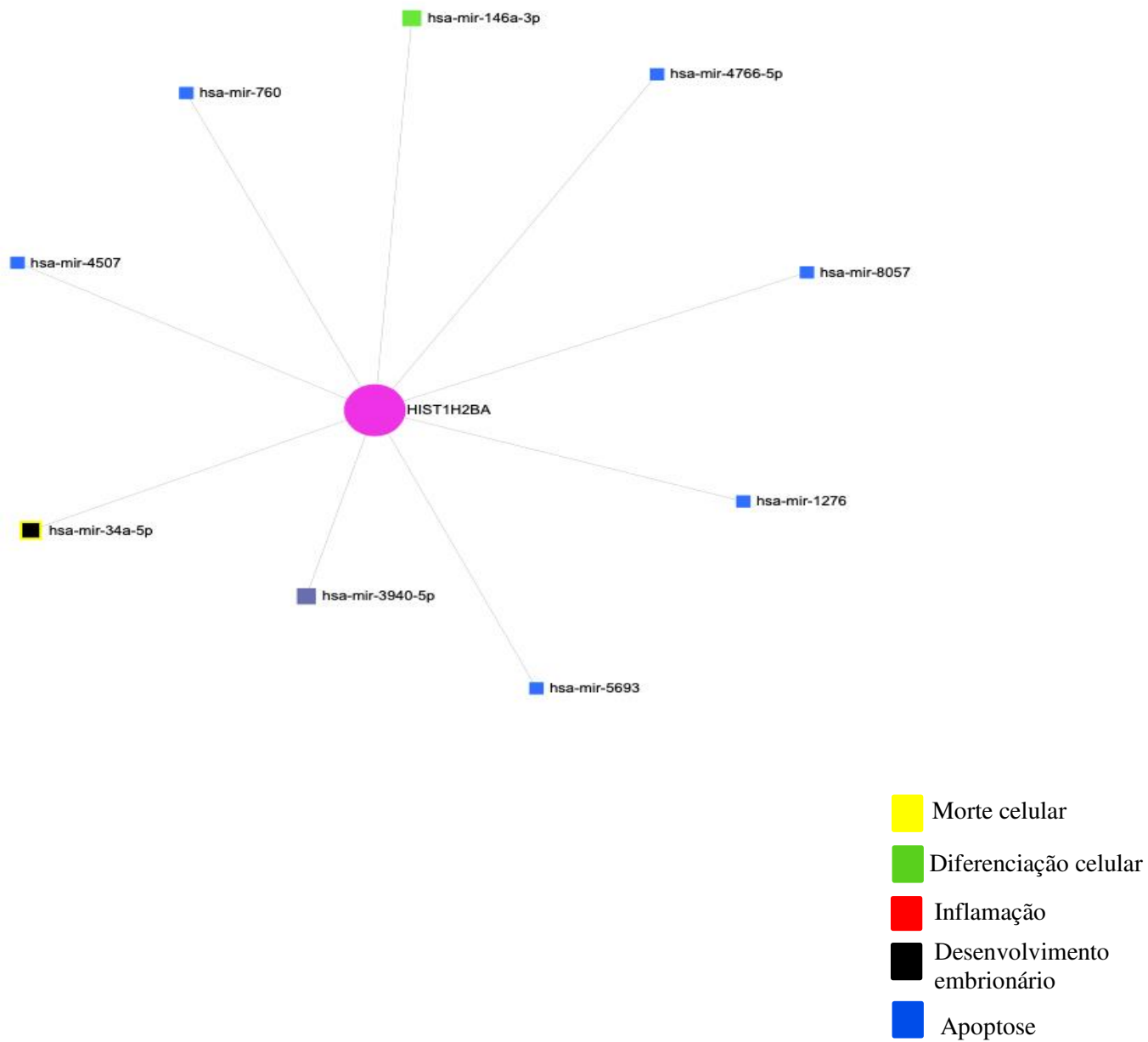


Tabela 6. Idade, peso, estatura, circunferência da cintura e classificação nutricional de homens com diferentes diagnósticos de fertilidade em centro de medicina reprodutiva.

Variáveis	Total (n = 19)	NZ ¹ (n = 5)	VAZ ² (n = 4)	VTZ ³ (n = 4)	VOTZ ⁴ (n = 6)	Valor de p
Idade (anos)	35,9 (6,4)	34,6 (7,1)	37,8 (7,1)	37,5 (8,3)	34,8 (5,2)	0,836
Peso (kg)	86,5 (12,1)	81,2 (12,1)	96,9 (10,4)	82,0 (10,5)	91,8 (11,1)	0,181
Estatura (m)	1,8 (0,1)	1,7 (0,1)	1,8 (0,1)	1,8 (0,0)	1,8 (0,1)	0,125
Circunferência da cintura (cm)	94,6 (13,1)	88,0 (16,7)	104,3 (6,2)	92,9 (10,4)	94,9 (13,6)	0,337
Índice de massa corporal (Kg/m ²)	28,4 (2,7)	28,2 (1,8) ^{ab}	31,6 (1,3) ^a	26,7 (3,4) ^b	28,0 (2,1) ^{ab}	0,034
Classificação nutricional						
<i>Eutrófico (%)</i>	2 (10,5)	0	0	1 (50,0)	1 (50,0)	
<i>Sobrepeso (%)</i>	11 (57,9)	4 (36,4)	0	2 (18,2)	5 (45,5)	0,036†
<i>Obesidade (%)</i>	6 (31,6)	1 (16,7)	4 (66,7)	1 (16,7)	0	

Os dados das variáveis numéricas foram apresentados em médias e desvio padrão (dp) e da variável categórica em frequências (n) e percentuais (%). NZ¹: normozoospermia; VAZ²: varicocele + astenozoospermia; VTZ³: varicocele + teratozoospermia; VOTZ⁴: varicocele + oligoteratozoospermia. Valor de P: teste ANOVA com pós-teste de Tukey (ab Letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos) para variáveis numéricas e †qui-quadrado de Pearson para variáveis categóricas. Significância estatística: p<0,05.

Tabela 7. Lista das 15 proteínas mais abundantes identificadas no plasma seminal de homens diagnosticados como normozoospermicos (NZ).

Protein accession code	Gene (UniProt)^a	Spectrum count	Protein description
P12429	ANXA3	13	Annexin A3
A0A0A0MSI0	PRDX1	8	Peroxiredoxin-1
Q9NQ79	CRAC1	7	Cartilage acidic protein 1
P80748	IGLV3-21	6	Immunoglobulin lambda variable 3-21
E2R3K1	E2R3K1	5	Tr-type G domain-containing protein
P29392	SPADH1	5	Spermadhesin-1
A0A3Q1M4L6	H2BC14	4	H2B clustered histone 14
Q9UNW1	MINPP1	4	Multiple inositol polyphosphate phosphatase 1
M0QX14	TUBB4	4	Tubulin beta-4 ^a
P32933	VP6	4	Protein VP6
E5RGE1	E5RGE1	3	14-3-3 protein zeta/delta
A0A3Q1MZ82	PKD1L3	3	Polycystin 1 like 3
Q65749	VP3	3	Core protein VP3
P82292	Z13	3	Spermadhesin Z13
P80188	LCN2	2	Neutrophil gelatinase-associated lipocalin

^aDe acordo com a abreviação do gene em UniProt.

Tabela 8. Lista das 15 proteínas mais abundantes identificadas no grupo varicocele astenozoospermico (VAZ).

Protein accession code	Gene (UniProt)^a	Spectrum count	Protein description
P0DOY3	IGLC3	28	Immunoglobulin lambda constant 7
A0A0B4J231	IGLC1	9	Immunoglobulin lambda-like polypeptide 5
Q96A08	H2BC1	8	Histone H2B type 1-A
P01011	SERPINA3	7	Alpha-1-antichymotrypsin
P08185	SERPINA6	7	Corticosteroid-binding globulin
O60814	H2BC12	6	Histone H2B type 1-K
A0A5F4BS52	A0A5F4BS52	5	Uncharacterized protein
Q8IZJ3	CPAMD8	5	C3 and PZP-like alpha-2-macroglobulin domain-containing protein 8
Q9H3G5	CPVL	5	Probable serine carboxypeptidase CPVL
Q14687	GSE1	5	Genetic suppressor element 1
A0A5F4CIE3	H2AC15	4	Histone H2A
A1A4R1	H2AC20	4	Histone H2A type 2-C
F2Z4J1	H2AC6	4	Histone H2A
F1MLQ1	LOC524236	4	Synaptotagmin-like protein 1
Q8NCC3	PLA2G15	4	Phospholipase A2 group XV

^aDe acordo com a abreviação do gene em UniProt.

Tabela 9. Lista das 15 proteínas mais abundantes identificadas no grupo varicocele oligoteratozoospermico (VOTZ).

Protein accession code	Gene (UniProt)^a	Spectrum count	Protein description
A0A3Q1LUJ2	LOC782966	8	Tubulin alpha
H3BMA1	MSLN	8	Mesothelin
A0A087WUJ7	A0A087WUJ7	7	Beta-N-acetylhexosaminidase
E2RJ31	LOC487375	6	Elongation factor 1-alpha
P35052	GPC1	5	Glypican-1
P35606	COPB2	4	Coatomer subunit beta
A0A3Q1LJP9	GRIPAP1	4	GRIP1 associated protein 1
A0A3Q1MIR5	A0A3Q1MIR5	3	1-cysPrx_C domain-containing protein
A0A1W2PRN6	LINC02218	3	HCG1807616
A0A5F4C1T2	STK10	3	Non-specific serine/threonine protein kinase
A0A5F4BSU4	ARHGEF28	2	Rho guanine nucleotide exchange factor 28
P05387	RPLP2	2	60S acidic ribosomal protein P2
A0A5F4C8Y0	TNS2	2	Tensin 2
F1Q4G7	TSHZ3	2	Teashirt zinc finger homeobox 3
J9P7B0	ZDBF2	2	Zinc finger DBF-type containing 2
A0A3Q1LUJ2	LOC782966	8	Tubulin alpha

^aDe acordo com a abreviação do gene em UniProt.

Table 10. Lista das 15 proteínas mais abundantes identificadas no grupo varicocele teratozoospermico (VTZ).

Protein accession code	Gene (UniProt) ^a	Spectrum count	Protein description
P02554	TBB	57	Tubulin beta chain
A0A0G2JIW1	HSPA1	27	Heat shock 70 kDa protein 1
L7N0G4	LOC610636	25	Tubulin alpha chain
A0A5F4D8G0	A0A5F4D8G0	25	Tubulin alpha chain
O60282	KIF5C	25	Kinesin heavy chain isoform 5C
F1MNF8	F1MNF8	24	Tubulin alpha chain
P08134	RHOC	23	Rho-related GTP-binding protein RhoC
P53675	CLTCL1	22	Clathrin heavy chain 2
P26038	MSN	22	Moesin
P11217	PYGM	20	Glycogen phosphorylase, muscle form
P61586	RHOA	20	Transforming protein RhoA
P33176	KIF5B	19	Kinesin-1 heavy chain
P0CG47	UBB	18	Polyubiquitin-B
Q8IYJ3	SYTL1	14	Synaptotagmin-like protein 1
P60174	TPI1	14	Triosephosphate isomerase

^a De acordo com a abreviação do gene em UniProt.

Tabela 11. Principais funções dos microRNAs envolvidos na regulação dos genes ANXA3, PRDX1, HSPA1B, KIF5C, H2BA e MSLN com base Inos maiores valores de P obtidos do banco de dados miRNet.

Gene	Função de miRNA	Alvos de miRNA
ANXA3 PRDX1	Via de sinalização mediada por hormônios	hsa-mir-27a-3p, hsa-mir-34a-5p, hsa-mir-126-3p, hsa-mir-1-3p, hsa-mir-124-3p
	Toxicidade	hsa-mir-27a-3p, hsa-mir-34a-5p, hsa-mir-126-3p, hsa-mir-1-3p
	Divisão celular	hsa-mir-27a -3p, hsa-mir-34a-5p, hsa-mir-124-3p
	Desenvolvimento embrionário	hsa-mir-34a-5p, hsa-mir-124-3p
	Efluxo de Colesterol	hsa-mir-27a-3p
HSPA1B KIF5C	Morte celular	hsa-mir-17-5p, hsa-mir-30d-5p, hsa-mir-34a-5p, hsa-mir-181a-5p, hsa-let-7a-5p, hsa-mir-21-5p, hsa-mir-203a-3p
	Diferenciação celular	hsa-mir-34a-5p, hsa-let-7a-5p, hsa-mir-9-5p, hsa-mir-218-5p, hsa-mir-124-3p, hsa-mir-203a-3p, hsa-mir-126-3p
	Inflamação	hsa-mir-34a-5p, hsa-mir-181a-5p, hsa-mir-9-5p, hsa-mir-124-3p, hsa-mir-203a-3p, hsa-mir-126-3p
	Apoptose	hsa-mir-34a-5p, hsa-mir-181a-5p, hsa-mir-9-5p, hsa-mir-203a-3p, hsa-mir-126-3p
	Desenvolvimento embrionário	hsa-mir-34a-5p, hsa-mir-21-5p, hsa-mir-124-3p

H2BA	Morte celular	hsa-mir-34a-5p, hsa-mir-146a-3p
	Reparação de Danos no DNA	hsa-mir-34a-5p, hsa-mir-3940-5p
	Estresse oxidativo	hsa-mir-146a-3p
	Inflamação	hsa-mir-34a-5p
	Apoptose	hsa-mir-34a-5p
MSLN	Estresse oxidativo	hsa-mir-21-5p
	Toxicidade	hsa-mir-21-5p
	Desenvolvimento embrionário	hsa-mir-21-5p
	Morte celular	hsa-mir-21-5p
	Motilidade Celular	hsa-mir-21-5p

Informações de Apoio

Tabela Suplementar 1. Parâmetros seminais e valores de referência recomendados pela OMS, 2021.

Tabela Suplementar 2. Médias e desvios padrões das variáveis (volume, concentração, motilidade total e progressiva, morfologia normal e patológica estrita de *Kruger*) avaliadas no sêmen de homens com diferentes diagnósticos de fertilidade. NZ: normozoospermia; VAZ: varicocele + astenozoospermia; VTZ: varicocele + teratozoospermia; VOTZ: varicocele + oligoteratozoospermia.

Tabela Suplementar 3. Lista global das proteínas identificadas nos grupos NZ (724), VTZ (1728), VAZ (886) e VOTZ (907).

Tabela Suplementar 4. Lista das proteínas únicas diferenciais identificadas em cada grupo 18 (NZ), 266 (VTZ), 55 (VAZ) e 15 (VOTZ).

Tabela Suplementar 5. Clusters de enriquecimento mais bem classificados de acordo com Metascap.

Tabela Suplementar 1. Parâmetros seminais e valores de referência recomendados pela OMS, 2021.

Parâmetros seminais	Valores recomendados
Abstinência	2 a 7 days
pH	6 a 10
Volume (mL)	$\geq 1,4$
Contagem de espermatozoide (milhões/mL)	$\geq 1,6$
Espermatozoide na ejaculação (milhões/mL)	$> 22,5$
Motilidade (A^1+B^2)	$\geq 30\%$
Motilidade Total ($A^1+B^2+C^3$)	$\geq 42\%$
% de formas vivas (eosin 0.5%)	$> 58\%$
Aglutinação	Ausência
Agregados	Ausência
Morfologia estrita de <i>Kruger</i> (% normal)	$\geq 4\%$
Leucócitos (10^6 /mL)	$< 1,0$
Vitalidade (vivo) – Teste Hiposmótico – 2 horas a 37°C	< 40
Zinco (μmol)	$> 2,4$
Frutose (μmol)	$\geq 3,0$
α -Glucosidase (mU) [> 20]	> 20

A¹:motilidade linear rápida e progressiva; B²:motilidade linear lenta ou progressiva; C³:motilidade não progressiva

Tabela Suplementar 2. Médias e desvios padrões das variáveis (volume, concentração, motilidade total e progressiva, morfologia normal e patológica estrita de *Kruger*) avaliadas no sêmen de homens com diferentes diagnósticos de fertilidade. NZ: normozoospermia; VAZ: varicocele + astenozoospermia; VTZ: varicocele + teratozoospermia; VOTZ: varicocele + oligoteratozoospermia.

Variáveis/ Grupos	N	Volume (mL)	Concentração (10 ⁶ / mL)	Motilidade Total (%)	Motilidade Progressiva (%)	<i>Kruger</i> Normal (%)	<i>Kruger</i> Patológico (%)
NZ ¹	1	4,6	18,2	78,0	45,0	4,0	96,0
	22	1,4	51,0	80,0	45,0	9,0	91,0
	29	6,3	16,6	76,0	40,0	6,0	96,0
	31	2,3	24,1	75,0	54,0	6,0	96,0
	39	1,0	60,0	77,0	63,0	10,0	90,0
Média (DP)		3,1 (2,3)	34,0 (20,1)	77,2 (1,9)	44,9 (9,1)^a	7,0 (2,4)^a	93,0 (2,4)^a
VAZ ²	9	1,4	101,5	43,0	8,0	2,0	98,0
	10	4,7	26,0	54,0	19,0	4,0	96,0
	97	5,0	20,0	47,0	22,0	0,0	100,0
	120	3,8	20,5	73,0	24,0	4,0	96,0
Média (DP)		3,7 (1,6)	42,0 (39,8)	54,3 (13,3)	18,3 (7,1)^b	2,5 (1,9)^b	97,5 (1,9)^b

Variáveis/ Grupos	N	Volume	Concentração	Motilidade	Motilidade	Kruger	Kruger
		(mL)	(10⁶/ mL)	Total (%)	Progressiva (%)	Normal (%)	Patológico (%)
VTZ³	8	3,0	27,8	82,0	8,0	2,0	98,0
	51	6,9	21,9	73,0	46,0	1,0	99,0
	54	2,8	30,0	80,0	37,0	3,0	97,0
	119	5,6	57,0	86,0	51,0	2,0	98,0
Média (DP)		4,6 (2,0)	34,2 (15,6)^a	80,3 (5,4)	35,5 (19,2)^a	2,0 (0,8)^b	98,0 (0,8)^b
VOTZ⁴	16	3,8	3,3	39,0	9,0	2,0	98,0
	64	5,5	4,9	59,0	37,0	3,0	97,0
	68	5,3	0,6	67,0	33,0	1,0	99,0
	72	3,0	10,0	80,0	50,0	3,0	97,0
	100	2,3	1,7	94,0	47,0	4,0	96,0
	131	2,9	5,0	40,0	26,0	1,0	99,0
Média (DP)		3,8 (1,3)	4,3 (3,3)^b	63,2 (21,8)	33,7 (15,0)	2,3 (1,2)^b	97,7 (1,2)^b
Valor de p		0,702	0,007[£]	0,071[£]	0,003	0,002	0,002

N = número do participante da pesquisa; NZ¹: normozoospermia; VAZ²: varicocele + astenozoospermia; VTZ³: varicocele + teratozoospermia; VOTZ⁴: varicocele + oligoteratozoospermia. Dados apresentados em média (desvio padrão). P-valor: teste ANOVA ou teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Tukey (letras diferentes indicam diferença entre os grupos). Significância estatística: p <0,05.

Tabela Suplementar 5. Clusters de enriquecimento classificados de acordo com o Metascap.

Grupos	Processos biológicos GO e termos KEGG*	Genes
NZ	Desgranulação de neutrófilos	A1BG AOC1 ACLY ACP3 ALDOA ALDOC ANPEP ANXA2 APEH APRT RHOA ARSA B2M C3 CAMP CAPN1 CD14 CST3 CSTB CTSB CTSD CTSH DYNC1H1 EEF1A1 EEF2 FUCA1 FUCA2 GAA GDI2 B4GALT1 GLA GLB1 GPI GSTP1 HEXB HP HSPA1A HSPA1B HSPA6 HSPA8 HSP90AA1 HSP90AB1 IDH1 IGF2R KRT1 LGALS3 LTA4H LTF MANBA MIF MME NME2 PNP PAFAH1B2 PFKL PGAM1 SERPINA1 SERPINB6 PKM PIPA PRCP MAPK1 PRSS2 PSAP PSMA2 PSMB1 PSMD3 QSOX1 PYGB PYGL RAB3A RAB5B RAB27A RAB5C RAC1 RAP1A RAP1B SDCBP TIMP2 TTR VCP RAB7A PDXX RNASET2 IQGAP1 MGAM RAB3D PRDX6 ACTR2 CRISP3 TUBB4B ATP8A1 CAP1 VAT1 PRDX4 OLFM4 CCT2 NPC2 CCT8 RAB10 HEBP2 DBNL DPP7 RAB14 CAB39 TOLLIP CAND1 CD177 CRISPLD2 CRACR2A LRG1 CANT1 TUBB
	Transporte mediado por vesículas	ACTB ACTG1 ALB APOA1 ARF1 ARF3 ARF4 ARF5 ARF6 CALR CAPZA1 CAPZA2 CAPZB CLTA CLTC DYNC1H1 GDI1 GDI2 SFN HP HPX HSPA8 HSP90AA1 IGF2R KIF5A KIF5B RAB8A MYH9 MYO1C MYO6 NSF PAFAH1B1 PAFAH1B2 SERPINA1 RAB1A RAB3A RAB5A RAB5B RAB27A RAB27B RAB5C RAC1 RALA SRC VAMP2 TF HSP90B1 TSG101 TUBA4A TUBA3C TUBB2A UBA52 UBB YWHAB YWHAE YWHAG YWHAH YWHAZ TUBA1A RAB7A CLTCL1 GBF1 RAB11A NAPA RAB11B VAMP3 ACTR2 TUBA1B TUBB3 TUBB4A TUBB4B HYOU1 DCTN2 RAB10 YWHAQ RAB14 TUBA8 VPS37C NAPB VPS37B TUBAL3 TUBB1 RAB1B TUBB6 TUBA1C SYTL1 TUBA3E TUBA3D TUBB8 TUBB2B
	Via do sistema proteassômico parkin-ubiquitina	HSPA1A HSPA1B HSPA1L HSPA2 HSPA5 HSPA6 HSPA8 TUBA4A TUBA3C TUBB2A UBA1 TUBA1A TUBA1B TUBB3 TUBB4A TUBB4B TUBA8 TUBB6 TUBA3E TUBB TUBB8 TUBB2B
VTZ	Desgranulação de neutrófilos	A1BG AOC1 ACLY ACP3 ALDOA ALDOC ANPEP ANXA2 APEH APRT RHOA ARSA B2M C3 CAMP CAPN1 CD14 CST3 CSTB CTSB CTSD CTSH DYNC1H1 EEF1A1 EEF2 FUCA1 FUCA2 GAA GDI2 B4GALT1 GLA GLB1 GPI GSTP1 HEXB HP HSPA1A HSPA1B HSPA6 HSPA8 HSP90AA1 HSP90AB1 IDH1 IGF2R KRT1 LGALS3 LTA4H LTF MANBA MIF MME NME2 PNP PAFAH1B2 PFKL PGAM1 SERPINA1 SERPINB6 PKM PIPA PRCP MAPK1 PRSS2 PSAP PSMA2 PSMB1 PSMD3 QSOX1 PYGB PYGL RAB3A RAB5B RAB27A RAB5C RAC1 RAP1A RAP1B SDCBP TIMP2 TTR VCP RAB7A PDXX RNASET2 IQGAP1 MGAM RAB3D PRDX6 ACTR2 CRISP3 TUBB

		4B ATP8A1 CAP1 VAT1 PRDX4 OLFM4 CCT2 NPC2 CCT8 RAB10 HEBP2 DBNL DPP7 RAB14 CAB39 TOLLIP CAND1 CD177 CRISPLD2 CRACR2A LRG1 CANT1 TUBB
	Transporte mediado por vesículas	ACTB ACTG1 ALB APOA1 ARF1 ARF3 ARF4 ARF5 ARF6 CALR CAPZA1 CAPZA2 CAPZB CLTA CLTC DYNC1H1 GDI1 GDI2 SFN HP HPX HSPA8 HSP90AA1 IGF2R KIF5A KIF5B RAB8A MYH9 MYO1C MYO6 NSF PAFAH1B1 PAFAH1B2 SERPINA1 RAB1A RAB3A RAB5A RAB5B RAB27A RAB27B RAB5C RAC1 RALA SRC VAMP2 TF HSP90B1 TSG101 TUBA4A TUBA3C TUBB2A UBA52 UBB YWHAB YWHAE YWHAG YWHAH YWHAZ TUBA1A RAB7A CLTCL1 GBF1 RAB11A NAPA RAB11B VAMP3 ACTR2 TUBA1B TUBB3 TUBB4A TUBB4B HYOU1 DCTN2 RAB10 YWHAQ RAB14 TUBA8 VPS37C NAPB VPS37B TUBAL3 TUBB1 RAB1B TUBB6 TUBA1C SYTL1 TUBA3E TUBA3D TUBB8 TUBB2B
	Hemostasia	A1BG A2M ACTB ACTN4 ACTN1 ALB ALDOA ANXA2 ANXA5 APOA1 RHOA CAPZA1 CAPZA2 CAPZB CD9 CDC42 CFL1 CLU ECM1 FN1 GAS6 GLG1 GNAI2 GNAI3 GNAS GNB1 GNB2 HSPA5 KIF5A KIF5B LGALS3BP MIF SERPINA5 PFN1 SERPINA1 SERPINB6 SERPINF2 PPIA PPP2R1A PPP2R1B PRCP PRKACA PRKACB PRKAR1A PRKAR2A PRKAR2B MAPK1 PSAP QSOX1 RAB5A RAB27B RAC1 RAP1A RAP1B SRC STXB2P2 TF TIMP1 TLN1 TUBA4A TUBA3C TUBB2A YWHAZ TUBA1A TAGLN2 WDR1 TUBA1B TUBB3 TUBB4A TUBB4B CAP1 TUBA8 CD177 GNB4 CHID1 TUBAL3 TUBB1 TUBB6 TUBA1C SYTL4 TUBA3E TUBA3D TUBB8 TUBB2B
VAZ	Desgranulação de neutrófilos	SERPINA3 AOC1 ACLY ACP3 ALDOA ALDOC ANPEP ANXA2 C3 CAMP CD14 CST3 CTSB CTSD CTSH EEF1A1 EEF2 FUCA1 GAA GDI2 B4GALT1 GLB1 GPI GSTP1 HBB HEXB HP HSPA1A HSPA1B HSPA6 HSPA8 HSP90AA1 HSP90AB1 IDH1 KRT1 LTF MANBA MME MPO NEU1 ORM1 ORM2 PAFAH1B2 PGAM1 SERPINA1 SERPINB6 PIGR PKM PPIA PRSS2 PSAP PSMA2 QSOX1 RAB27A RAP1A RAP1B SDCBP TIMP2 TTR RNASET2 MGM RAB3D PRDX6 ATP6AP2 TUBB4B PRDX4 OLFM4 NPC2 DPP7 CD177 CRISPLD2 LRG1 CANT1 TUBB
	Hemostasia	SERPINA3 ACTB ACTN4 ALB ALDOA ANXA2 ANXA5 APOA1 CAPZA1 CAPZA2 CFL1 CLU ECM1 FN1 GAS6 GLG1 GUCY1A1 HBB HSPA5 LGALS3BP ORM1 ORM2 SERPINA5 PFN1 SERPINA1 SERPINB6 SERPINF2 PPIA PRKAR2A PSAP QSOX1 RAB27B RAP1A RAP1B SELENOP SLC3A2 TF TIMP1 TUBA4A TUBA3C TUBB2A WEE1 YWHAZ TUBA1A TUBA1B TUBB3 TUBB4A TUBB4B TUBA8 CD177 CHID1 TUBB6 TUBA1C TUBA3E TUBB8 TUBB2B
	Ciclo de chaperonas HSP90 para receptores de hormônios esteróides na presença de ligante	CAPZA1 CAPZA2 HSPA1A HSPA1B HSPA1L HSPA2 HSPA8 HSP90AA1 HSP90AB1 TUBA4A TUBA3C TUBB2A TUBA1A TUBA1B TUBB3 TUBB4A TUBB4B TUBA8 TUBB6 TUBA1C TUBA3E TUBB8 TUBB2B

VOTZ	Desgranulação de neutrófilos	A1BG AOC1 ACLY ACP3 ALDOA ALDOC ANPEP ANXA2 ASAH1 B2M C3 CAMP CD14 CST3 CTSB CTSD DYNC1H1 EEF1A1 FUCA1 FUCA2 GAA GDI2 B4GALT1 GLA GLB1 GPI GSTP1 HEXB HSPA1A HSPA1B HSPA6 HSPA8 HSP90AA1 HSP90AB1 IDH1 KRT1 LTF MANBA MIF MME PNP ORM2 PAFAH1B2 PFKL SERPINA1 PIGR PKM PPIA PRCP PSAP PSMA2 PSMB1 QSOX1 PYGB RAB27A RAP1A RAP1B SDCBP STK10 TIMP2 TTR VCP RNASET2 MGAM RAB3D PRDX6 CRISP3 TUBB4B CAP1 PRDX4 OLFM4 NPC2 DPP7 CD177 LRG1 CANT1 TUBB
	Hemostasia	A1BG ACTB ACTN4 ALB ALDOA ANXA2 ANXA5 APOA1 CAPZA1 CAPZA2 CFL1 CLU ECM1 FN1 GAS6 GLG1 GNAI2 GPC1 HSPA5 LGALS3BP MIF ORM2 SERPINA5 PFN1 SERPINA1 SERPINF2 PPIA PRCP PRKAR2A PSAP QSOX1 RAB27B RAP1A RAP1B SELENOP SLC3A2 TF TIMP1 TUBA4A TUBA3C TUBB2A WEE1 YWHAZ TUBA1A TUBA1B TUBB3 TUBB4A TUBB4B CAP1 TUBA8 CD177 CHID1 TUBB6 TUBA1C TUBA3E TUBB8 TUBB2B
	Ciclo de chaperonas HSP90 para receptores de hormônios esteróides na presença de ligante	CAPZA1 CAPZA2 DYNC1H1 HSPA1A HSPA1B HSPA1L HSPA2 HSPA8 HSP90AA1 HSP90AB1 TUBA4A TUBA3C TUBB2A TUBA1A TUBA1B TUBB3 TUBB4A TUBB4B TUBA8 TUBB6 TUBA1C TUBA3E TUBB8 TUBB2B

*KEGG: *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste estudo, as informações obtidas por meio da análise do perfil antropométrico dos homens atendidos no centro de medicina reprodutiva, garantem informações sobre obesidade e circunferência da cintura, este último um marcador de adiposidade central que traz prejuízos aos parâmetros seminais.

Portanto, demonstrou-se que a associação entre o IMC, circunferência da cintura, doenças metabólicas na família, como diabetes *mellitus* e hipertensão, bem como o uso de medicamentos são fatores de risco que afetam diretamente a saúde masculina. Além disso, por meio do proteoma fornecemos informações importantes acerca de proteínas e vias importantes do plasma seminal de homens com perfil seminal normal e àqueles com diagnóstico clínico de varicocele e suas respectivas alterações seminais.

Elucidamos as principais proteínas diferencialmente expressas nesses grupos, possibilitando a identificação de marcadores para a fertilidade masculina com elevado padrão de acurácia comparado ao espermograma, considerado atualmente padrão ouro no diagnóstico seminal, mas com limitações, como o potencial de fertilidade dos espermatozoides.

Tal achado representa uma contribuição das abordagens proteômicas no diagnóstico precoce da fertilidade masculina, contribuindo para condutas clínicas bem definidas, aumentando as chances de gravidez desse casal.

Além disso, a caracterização dessas vias metabólicas e quantificação dos marcadores seminais possibilita um incremento tecnológico na área de reprodução humana com desenvolvimento de testes rápidos que possibilitam menor custo do tratamento, maior adesão a realização de exames seminais, por não levar ao constrangimento e diagnóstico rápido, pela redução do tempo na investigação da fertilidade que gera angústia, medo, estresse e estigmatização da sociedade desse homem.

REFERÊNCIAS

- AALBERTS, M.; STOUT, T.A.; STOORVOGEL, W. Prostatosomes: extracellular vesicles from the prostate. **Reproduction**, [s. l.], v. 147, n.1, p. R1-14, 2013. DOI: 10.1530/REP-13-0358. Disponível em: <https://rep.bioscientifica.com/view/journals/rep/147/1/R1.xml>. Acesso em: 15 jun.2023.
- ABOBAKER, A.; RABA, A.A. Does COVID-19 affect male fertility? **World J Urol**, [s. l.], v. 39, n.3, p. 975-976, 2021. DOI: 10.1007/s00345-020-03208-w. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7171435/>. Acesso em: 29 sep. 2022.
- AGARWAL, A.; HAMADA, A.; ESTEVES, S.C. Insight into oxidative stress in varicocele-associated male infertility: part 1. **Nat Rev Urol**, [s. l.], v. 9, n.12, p. 678-690, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1038/nrurol.2012.197>. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nrurol.2012.197>. Acesso em: 3 mar. 2023.
- AGARWAL, A.; BASKARAN, S.; PAREKH, N.; CHO, C.L.; HENKEL, R.; VIJ, S.; ARAFA, M.; PANNER SELVAM, M.K.; SHAH, R. Male infertility. **Lancet**, [s. l.], v. 23, n. 397, p.319-333, 2021a. DOI: 10.1016/S0140-6736(20)32667-2. Disponível em: [https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736\(20\)32667-2/fulltext](https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736(20)32667-2/fulltext). Acesso em: 24 mar. 2023.
- AGARWAL, A.; BERTOLLA, R.P.; SAMANTA, L. Sperm proteomics: potential impact on male infertility treatment. **Expert Rev Proteomics**, [s. l.], v.13, n.3, p.285-96, 2016. DOI: 10.1586/14789450.2016. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1586/14789450.2016.1151357?journalCode=ieru20>. Acesso em: 5 oct. 2022.
- AGARWAL, A.; DURAIRAJANAYAGAM, D.; DU PLESSIS, S.S. Utility of antioxidants during assisted reproductive techniques: an evidence based review. **Reprod Biol Endocrinol**, [s. l.], v.12, n. 112, p. 1-19, 2014. DOI: 10.1186/1477-7827-12-112. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4258799/>. Acesso em: 21 jan. 2022.
- AGARWAL, A.; FINELLI, R.; SELVAM, M.; LEISEGANG, K.; MAJZOUB, A.; TADROS, N.; KO, E.; PAREKH, N.; HENKEL, R.; DURAIRAJANAYAGAM, D.; COLPI, G. M.; CHO, C. L.; SALLAM, H. N.; PARK, H. J.; SALEH, R.; MICIC, S.; AMBAR, R. F.; ZINI, A.; TREMELLEN, K.; ALVAREZ, J. G. et al. A Global Survey of Reproductive Specialists to Determine the Clinical Utility of Oxidative Stress Testing and Antioxidant Use in Male Infertility. **The world journal of men's health**, [s. l.], v. 39, n. 3, p.470–488, 2021b. DOI: 10.5534/wjmh.210025. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8255391/>. Acesso em: 24 jan. 2022.
- AGARWAL, A.; MULGUND, A.; HAMADA, A.; CHYATTE, M.R. A unique view on male infertility around the globe. **Reprod Biol Endocrinol**, [s. l.], v. 13, n.37, p.1-9, 2015a. DOI: 10.1186/s12958-015-0032-1. Disponível em: <https://rbej.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12958-015-0032-1>. Acesso em: 29 jan. 2021.
- AGARWAL, A.; SHARMA, R.; DURAIRAJANAYAGAM, D.; AYAZ, A.; CUI, Z.; WILLARD, B.; GOPALAN, B.; SABANEH, E. Major protein alterations in spermatozoa from infertile men with unilateral varicocele. **Reprod Biol Endocrinol**, [s. l.], v. 13, n. 8, p.

1-22, 2015b. DOI: 10.1186/s12958-015-0007-2. Disponível em:
<https://rbej.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12958-015-0007-2>. Acesso em: 17 jan. 2022.

AGARWAL, A.; PAREKH, N.; PANNER SELVAM, M.K.; HENKEL, R.; SHAH, R.; HOMA, S.T.; RAMASAMY, R.; KO, E.; TREMELLEN, K.; ESTEVES, S.; MAJZOUN, A.; ALVAREZ, J.G.; GARDNER, D.K.; et al. Male Oxidative Stress Infertility (MOSI): Proposed Terminology and Clinical Practice Guidelines for Management of Idiopathic Male Infertility. **World J Mens Health**, [s. l.], v.37, n.3, p.296-312, 2019. DOI: 10.1111/j.2047-2927.2013.00110.x. Disponível em :
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3752331/>. Acesso em: 28 Aug. 2021.

AGARWAL, A.; SEKHON, L.H. The role of antioxidant therapy in the treatment of male infertility. **Hum Fertil (Camb)**, [s. l.], v.13, n. 4, p. 217–25, 2010. DOI: 10.3109/14647273.2010.532279. Disponível em:
<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.3109/14647273.2010.532279?journalCode=ihuf20>. Acesso em: 21 jan. 2022.

AGARWAL, A.; PAREKH, N.; PANNER SELVAM, M.K.; HENKEL, R.; SHAH, R., HOMA, S.T.; RAMASAMY, R.; KO, E.; TREMELLEN, K.; ESTEVES, S.; MAJZOUN, A. et al. Male Oxidative Stress Infertility (MOSI): Proposed Terminology and Clinical Practice Guidelines for Management of Idiopathic Male Infertility. **World J Mens Health**, [s. l.], v. 37, n.3, p. 296-312, 2019. DOI: 10.5534/wjmh.190055. Disponível em:
<https://wjmh.org/DOIx.php?id=10.5534/wjmh.190055>. Acesso em: 29 Aug. 2021.

AGARWAL, A.; BASKARAN, S.; PANNER SELVAM, M.K.; BARBĂROȘIE, C.; MASTER, K. Unraveling the Footsteps of Proteomics in Male Reproductive Research: A Scientometric Approach. **Antioxid Redox Signal**, [s. l.], v.32, n.8, p. 536-549, 2020. DOI: 10.1089/ars.2019.7945. Disponível em:
https://www.liebertpub.com/doi/10.1089/ars.2019.7945?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub%20%20pubmed. Acesso em: 25 may.2023.

AGARWAL, A.; SHARMA, R.; DURAIRAJANAYAGAM, D.; CUI, Z.; AYAZ, A., GUPTA, S.; SABANEKH, E. Spermatozoa protein alterations in infertile men with bilateral varicocele. **Asian Journal of Andrology**, [s. l.], v. 18, n.1, p.43–53, 2016. DOI: 10.4103/1008-682X.153848. Disponível em:
<https://journals.lww.com/ajandrology/pages/default.aspx> Acesso em: 17 jan. 2022.

AGHAREZAEI, N. ; HASHEMI, ; SHAHANI, ; GILANY, K. Male Infertility, Precision Medicine and Systems Proteomics. **J Reprod Infertily**, [s. l.], v.19, n.4, p.185–192, 2018. PMID: 30746333; PMCID: PMC6328981. Disponível em:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6328981/>. Acesso em: 24 nov.2022.

ALSAIKHAN, B.; ALRABEEAH, K.; DELOUYA, G.; ZINI, A. Epidemiology of varicocele. **Asian J Androl**, v. 18, n.2, p.179-81, 2016. DOI: 10.4103/1008-682X.172640. Disponível em : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4770482/>. Acesso em: 17 aug. 2021.

AMARAL, A.; PAIVA, C.; ATTARDO PARRINELLO, C. et al. Identification of proteins involved in human sperm motility using high-throughput differential proteomics. **J Proteome**

Res, [s. l.], v. 13, n. 12, p. 5670-5684, 2014. DOI: 10.1021/pr500652y. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/pr500652y>. Acesso em: 27 may.2023.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **SisEmbrio: 13º relatório do sistema nacional de produção de embriões**. 13. ed: Brasília: DF, 2019. 14 p. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/centraisdeconteudo/publicacoes/sangue-tecidos-celulas-e-orgaos/relatorios-de-producao-de-embrioes-sisembrio>. Acesso em: 21 jan.2023.

APARICIO PRIETO, M. V.; RODRÍGUEZ GALLEGU, M. V.; VALDIVIA PALACÍN, A.; FRANCO IRIARTE, Y.; HERVÁS BARBARA, G.; ECHEVARRÍA ORELLA, E.; CASIS SAENZ, L. Local renin angiotensin system and sperm DNA fragmentation. **Asian journal of andrology**, [s. l.], v. 24, n. 2, p. 139–146, 2022. DOI: 10.4103/aja202150. Disponível em: <https://journals.lww.com/ajandrology/pages/default.aspx>. Acesso em: 16 feb. 2023.

ARYA, D.; BALASINOR, N.; SINGH, D. Varicocoele-associated male infertility: Cellular and molecular perspectives of pathophysiology. **Andrology**, [s. l.], v. 10, n.8, p.1463-1483, 2022. DOI: 10.1111/andr.13278. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/andr.13278>. Acesso em: 26 jan.2023.

BALBACH, M.; GHANEM, L.; ROSSETTI, T.; KAUR, N.; RITAGLIATI, C.; FERREIRA, J.; KRAPP, D.; PUGA MOLINA, L.C.; SANTI, C.M.; HANSEN, J.N.; et al. Soluble Adenylyl Cyclase Inhibition Prevents Human Sperm Functions Essential for Fertilization. **Mol. Hum. Reprod**, [s. l.], v.27, n.9, p. 1-11, 2021. DOI: 0.1093/molehr/gaab054. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8473925/>. Acesso em: 15 jun.2023.

BARBAGALLO, F.; CONDORELLI, R.A.; MONGIOÌ, L.M.; CANNARELLA, R., CIMINO, L.; MAGAGNINI, M.C.; CRAFA, A.; LA VIGNERA, S.; CALOGERO, A.E. Molecular Mechanisms Underlying the Relationship between Obesity and Male Infertility. **Metabolites**, [s. l.], v. 11, n. 12, p.840, 2021. DOI: 10.3390/metabo11120840. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8706114/>. Acesso em: 19 mar. 2023.

BARBOSA, E.B.; VIDOTTO, A.; POLACHINI, G.M.; HENRIQUE, T.; DE MARQUI, A.B.T.; TAJARA, E.H. Proteomics: methodologies and applications to the study of human diseases. **Revista da Associação Médica Brasileira**, [s. l.], v. 58, n. 3, p. 366-375, 2012. PMID: 22735231. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/ramb/a/rbzzwDkg4gWNqcPSLNMK6wD/?lang=en>. Acesso em: 5 dez. 2022.

BARRANCO, I.; RUBÉR, M.; PEREZ-PATÍÑO, C.; ATIKUZZAMAN, M.; MARTINEZ, E.A.; ROCA, J.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. The Seminal Plasma of the Boar is Rich in Cytokines, with Significant Individual and Intra-Ejaculate Variation. **Am J Reprod Immunol**, [s. l.], v.74, n. 6, p. 523-32, 2015. DOI: 10.1111/aji.12432. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/aji.12432>. Acesso em: 13 jun.2023.

BARRATT, C.L.R.; BJÖRND AHL, L.; DE JONGE, C.J.; LAMB, D.J.; MARTINI, F.O.; MCLACHLAN, R.; OATES, R.D.; VAN DER POEL, S.; Bianca ST JOHN, B.; SIGMAN, M.; SOKOL, R; TOURNAYE, H. The diagnosis of male infertility: an analysis of the evidence to support the development of global WHO guidance - challenges and future research opportunities. **Human Reproduction Update**, [s. l.], v.23, n.6 p. 660–680, 2017. DOI: 10.1093/humupd/dmx021. Disponível em:

<https://academic.oup.com/humupd/article/23/6/660/3979420?login=false>
Acesso em: 16 mar. 2022.

BIAN, H.; MÍNGUEZ-ALARCÓN, L.; SALAS-HUETOS, A.; BAUER, D.; WILLIAMS, P.L.; SOUTER, I.; ATTAMAN, J.; CHAVARRO, J.E. EARTH Study Team. Male waist circumference in relation to semen quality and partner infertility treatment outcomes among couples undergoing infertility treatment with assisted reproductive technologies. **Am J Clin Nutr**, [s. l.], v.115, n.3p. 833-842, 2022. DOI: 10.1093/ajcn/nqab364. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8895222/>
Acesso em: 25 nov. 2022.

BIENIEK, J.M ; DRABOVICH, A.P. ; LO, K.C. Seminal biomarkers for the evaluation of male infertility. **Asian J Androl**, [s. l.], v.18, n.3, p.426–433, 2016. DOI: 10.4103/1008-682X.175781. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4854096/>.
Acesso em: 21 jan. 2021.

BIENIEK, J.M.; KASHANIAN, J.A.; DEIBERT, C.M.; GROBER, E.D.; LO, K.C.; BRANNIGAN, R.E.; SANDLOW, J.I.; JARVI, K.A. Influence of increasing body mass index on semen and reproductive hormonal parameters in a multi-institutional cohort of subfertile men. **Fertil Steril**, [s. l.], v. 106, n.5, p.1070-1075, 2016. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2016.06.041. Disponível em: [https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0015-0282\(16\)61396-1](https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0015-0282(16)61396-1). Acesso em: 13 apr. 2023.

BIENIEK, J.M.; LO, K.C. Recent advances in understanding & managing male infertility. **FICCOResearch**, (F1000 Faculty Rev):2756, [s. l.], p.1-7, 2016. DOI: 10.12688/f1000research.9375.1. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5130065/>. Acesso em: 18 apr. 2023.

BOIVIN, J.; BUNTING, L.; COLLINS, J.A.; NYGREN, K.G. International estimates of infertility prevalence and treatment-seeking: potential need and demand for infertility medical care. **Hum Reprod**, [s. l.], v. 22, n.6, p.1506–1512, 2007.DOI: <https://doi.org/10.1093/humrep/dem046> Disponível em : <https://academic.oup.com/humrep/article/22/6/1506/609340?login=false>. Acesso em:10 jan.2020.

BRASIL (2018). Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Ações Programáticas Estratégicas. Saúde Sexual e Saúde Reprodutiva: os homens como sujeitos de cuidado / **Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde**, Departamento de Ações Programáticas Estratégicas. – Brasília: Ministério da Saúde, 2018. 56 p.

BREBAL, K.M.M.; SILVEIRA, J.A.C.; DE MENEZES, R.C.E.; EPIFÂNIO, S.B.O.; MARINHO, P.M.; LONGO-SILVA, G. Weight gain and changes in nutritional status of Brazilian adults after 20 years of age: a time-trend analysis (2006-2012). **Rev Bras Epidemiol**, [s. l.], 23: E200045, 2020. DOI: 10.1590/1980-549720200045 Disponível em: <https://chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcglclefindmkaj/https://www.scielo.br/j/rbepid/a/XBqDf6NVcKgnHtH6tJrCKYk/?format=pdf&lang=en>.Acesso em: 18 apr.2023.

CADAVID J., A.P.; ALVAREZ, A.; MARKERT, U.R.; MAYA, W. C. Differential protein expression in seminal plasma from fertile and infertile males. **Journal of Human Reproductive Sciences**, [s. l.], v. 7, n. 3, p.206-211, 2014. DOI: 10.4103/0974-1208.142485. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4229797/>. Acesso em: 18 apr.2023.

CAMARGO, M.; LOPES, P.I.; DEL GIUDICE, P.T.; CARVALHO, V.M.; CARDOZO, K.H.; ANDREONI, C.; FRAIETTA, R.; BERTOLLA, R.P. Unbiased label-free quantitative proteomic profiling and enriched proteomic pathways in seminal plasma of adult men before and after varicocelectomy. **Hum Reprod**, [s. l.], v.28, n.1, p.33-46, 2013. DOI: 10.1093/humrep/des357. Disponível em: <https://academic.oup.com/humrep/article/28/1/33/595657?login=false>. Acesso em: 18 aug. 2022.

CANDENAS, L.; CHIANESE, R. Exosome Composition and Seminal Plasma Proteome: A Promising Source of Biomarkers of Male Infertility. **Int J Mol Sci**, [s. l.], v. 21, n.19, p.1-27, 2020. DOI: 10.3390/ijms21197022. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7583765/>. Acesso em: 29 aug.2021.

CHEN, J.; CHEN, J.; FANG, Y.; SHEN, Q.; ZHAO, K.; LIU, C.; ZHANG, H. Microbiology and immune mechanisms associated with male infertility. **Front Immunol**, [s. l.], v.21, n.14, p. 1139450, 2023. DOI: 10.3389/fimmu.2023.1139450. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9989213/>. Acesso em: 5 oct. 2022.

CHO, C.L.; ESTEVES, S.C.; AGARWAL, A. Novel insights into the pathophysiology of varicocele and its association with reactive oxygen species and sperm DNA fragmentation. **Asian J Androl**, [s. l.], v. 18, n.2, p.186-93, 2016. DOI: 10.4103/1008-682X.170441. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4770484/>. Acesso em: 21 may. 2023.

CUNHA, L.M.S.C.P.; TEIXEIRA, M.Y.P.; DALTRO, A.F.C.S.; TORQUATO-FILHO, S.E.; ASSIS, R.C.; CELEDONIO, R.F.; PIRES, L.V.; MAIA, C.S.C.; GUEDES, M.I.F. Unbalance of Se and nutritional status in male infertility. **JBRA Assisted Reproduction**, [s. l.], v. 25, n.2, p.202–208, 2021. DOI: 10.5935/1518-0557.20200067. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8083850/>. Acesso em: 7 jan. 2022.

DA SILVA, B.F.; MENG, C.; HELM, D.; PACHL, F.; SCHILLER, J.; IBRAHIM, E.; LYNNE, C.M.; BRACKETT, N.L.; BERTOLLA, R.P.; KUSTER, B. Towards Understanding Male Infertility After Spinal Cord Injury Using Quantitative Proteomics. **Mol Cell Proteomics**, [s. l.], v.15, n. 4, p.1424-34, 2016. DOI: 10.1074/mcp.M115.052175. Disponível em: [https://www.mcponline.org/article/S1535-9476\(20\)33631-8/fulltext](https://www.mcponline.org/article/S1535-9476(20)33631-8/fulltext) Acesso em: 15 jun.2023.

DE AZEVEDO VIANA, A.G. et al. Functional attributes of seminal proteins in bull fertility: a systematic review. **Reproduction**, [s. l.], v. 161, n. 4, p. 459-475, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1530/REP-20-0392>. Disponível em: <https://rep.bioscientifica.com/view/journals/rep/161/4/REP-20-0392.xml>. Acesso em: 21 jan. 2021.

DE MATEO, S.; MARTÍNEZ-HEREDIA, J.; ESTANYOL, J.M.; DOMÍGUEZ-FANDOS, D.; VIDAL-TABOADA, J.M.; BALLESCÀ, J.L.; OLIVA, R. Marked correlations in protein expression identified by proteomic analysis of human spermatozoa. **Proteomics**, [s. l.], v.7, p.4264–4277, 2007. DOI: 10.1002/pmic.200700521. Disponível em: <https://analyticalsciencejournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/pmic>. Acesso em: 21 jan. 2021.

DEL GIUDICE, F.; KASMAN, A.M.; FERRO, M.; SCIARRA, A.; DE BERARDINIS, E.; BELLADELLI, F.; SALONIA, A.; EISENBERG, M.L. Clinical correlation among male infertility and overall male health: A systematic review of the literature. **Investig Clin Urol**, [s. l.], v.61, n.4, p.355-371, 2020. DOI: 10.4111/icu.2020.61.4.355. Disponível em: <https://analyticalsciencejournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/pmic>. Acesso em: 21 jan. 2021.

DIAS, T.R.; SAMANTA, L.; AGARWAL, A.; PUSHPARAJ, P.N.; SELVAM, M.K.P.; SHARMA, R. Antioxidant Defense and Proteasomal Activity in Fertile Men with High Seminal ROS Levels. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 20, n.1, p.1-14, 2019. DOI: 10.3390/ijms20010203. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1422-0067/20/1/203>. Acesso em: 21 jan. 2022.

DOUROU, P.; GOUROUTI, K.; LYKERIDOU, A.; GAITANOU, K.; PETROGIANNIS, N.; SARANTAKI, A. Quality of Life among Couples with a Fertility Related Diagnosis. **Clin Pract**, [s. l.], v.13, n. 1, p. 251-263, 2023. DOI: 10.3390/clinpract13010023. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9955447/>. Acesso em: 21 may. 2023.

DRUART, X.; DE GRAAF, S. Seminal plasma proteomes and sperm fertility. **Anim Reprod Sci**, [s. l.], v. 194, p.33-40, 2018. DOI: 10.1016/j.anireprosci.2018.04.061. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0378432017310898?via%3Dihub>. Acesso em: 10 jan. 2022.

DURAIRAJANAYAGAM, D. Lifestyle causes of male infertility. **Arab Journal of Urology**, [s. l.], v.16, n.1, p.10-20, 2019. DOI: 10.1016/j.aju.2017.12.004. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5922227/>. Acesso em: 2 may. 2021.

DUTTA, S.; SENGUPTA, P. SARS-CoV-2 and Male Infertility: Possible Multifaceted Pathology. **Reprod Sci**, [s. l.], v. 28, n.1, p. 23-26, 2021. DOI: 10.1007/s43032-020-00261-z. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7351544/>. Acesso em: 29 aug. 2021.

DRABOVICH, A.P.; SARAON, P.; JARVI, K.; DIAMANDIS, E.P. Seminal plasma as a diagnostic fluid for male reproductive system disorders. **Nat. Rev. Urol**, [s. l.], v.11, n.5, p. 278–288, 2014. DOI: 10.1038/nrurol.2014.74. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nrurol.2014.74>. Acesso em: 27 may. 2023.

EL-DAKHLY, M.R.; TAWADROUS, G.A.; MOSTAFA, T.; ROAIA, M.M.; EL-NASHAR, A.R.; SHEDEED, S.A.; KAMEL, I.I.; AZIZ, A.A.; EL-MOHTASEB, Y. Assessment of seminal plasma laminin in fertile and infertile men. **Asian J Androl**, [s. l.], v.9, n.1, p. 63-7, 2007. DOI: 10.1111/j.1745-7262.2007.00234.x. Disponível em: <http://www.asiaandro.com/Abstract.asp?doi=10.1111/j.1745-7262.2007.00234.x>. Acesso em: 13 jun. 2023.

ERENPREISS, J.; ELZANATY, S.; GIWERCMAN, A. Sperm DNA damage in men from infertile couples. **Asian J Androl**, [s. l.], v. 10, n. 5, p.786-90, 2008. DOI: 10.1111/j.1745-7262.2008.00417.x. Disponível em: <http://www.asiaandro.com/Abstract.asp?doi=10.1111/j.1745-7262.2008.00417.x> Acesso em: 17 jan. 2022.

FAINBERG, J.; KASHANIAN, J.A. Recent advances in understanding and managing male infertility **F1000Research**, [s. l.], v. 8, 2019. F1000 Faculty Rev: 670. DOI: <https://doi.org/10.12688/f1000research.17076.1>. Disponível em: <https://f1000research.com/articles/8-670/v1>. Acesso em: 19 jan. 2021.

FEIJÓ, C. M.; SPAINE, D. M.; TIBALDI, D. S.; ESTEVES, S. C. Espermograma. In: Atlas de Reprodução Humana Editores: DZIK, A.; DONADIO, N.F.; ESTEVES, S.; NAGY, Z.P. **Segmento Farma**, [s. l.], cap 4, p. 45-54, 2012. DOI: Disponível em: <chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcglclefindmkaj/http://androfert.com.br/arquivos/Espermograma.pdf>. Acesso em: 9 nov. 2020.

FLESCHE, F.M.; GADELLA, B.M. Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Biomembranes*, [s. l.], v. 1469, n.3, p. 2000. DOI: 10.1016/s0304-4157(00)00018-6. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0304415700000186?via%3Dihub> Acesso em: 6 sep. 2021.

FRACZEK, M.; KURPISZ, M. The redox system in human semen and peroxidative damage of spermatozoa. **Postępy higieny i medycyny doświadczalnej (Online)**, [s. l.], v. 59, p. 523-534, 2005. PMID: 16407791. Disponível em: <https://phmd.pl/resources/html/article/details?id=6618&language=en>. Acesso em: 27 may. 2023.

GAT, Y.; ZUKERMAN, Z.; CHAKRABORTY, J.; GORNISH, M. Varicocele, hypoxia and male infertility. Fluid Mechanics analysis of the impaired testicular venous drainage system. **Hum Reprod**, [s. l.], v. 20, n.9, p. 2614-2619, 2005. DOI: 10.1093/humrep/dei089. Disponível em: <https://academic.oup.com/humrep/article/20/9/2614/2356797?login=false>. Acesso em: 23 mar. 2023.

GIACOMINI, E.; URA, B.; GIOLO, E.; LUPPI, S.; MARTINELLI, M.; GARCIA, R.C.; RICCI, G. Comparative analysis of the seminal plasma proteomes of oligoasthenozoospermic and normozoospermic men. **Reprod. BioMed. Online**, [s. l.], v.30, 522–531, 2015. DOI: 10.1016/j.rbmo.2015.01.010. Disponível em: [https://www.rbmojournal.com/article/S1472-6483\(15\)00056-5/fulltext](https://www.rbmojournal.com/article/S1472-6483(15)00056-5/fulltext). Acesso em: 27 may.2023.

GILANY, K.; MINAI-TEHRANI, A.; SAVADI-SHIRAZ, E.; REZADOOST, H.; LAKPOUR, N. Exploring the human seminal plasma proteome: an unexplored gold mine of biomarker for male infertility and male reproduction disorder. **Journal of Reproduction & Infertility**, [s. l.], v. 16, p. 61-71, 2015. PMID: 25927022; PMCID: PMC4386088. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25927022/>. Acesso em: 8 nov. 2021.

GUERRA, M.O.; PETERS, V.M. Como um mamífero se desenvolve desde a fertilização até a implantação. **Boletim do Centro de Biologia da Reprodução**, [s. l.], v. 18, p. 15-32, 1999.

Disponível em: <https://periodicos.ufjf.br/index.php/boletimcbr/article/view/17016>. Acesso em: 27 may. 2023.

HASHEMITABAR, M.; SABBAGH, S.; ORAZIZADEH, M.; GHADIRI, A.; BAHMANZADEH, M. A proteomic analysis on human sperm tail: comparison between normozoospermia and asthenozoospermia. **J Assist Reprod Genet**, [s. l.], v.32, n. 6, p. 853-63, 2015 DOI: 10.1007/s10815-015-0465-7. Disponível: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4491089/>. Acesso em: 04 out. 2022.

HOSSEINZADEH, C.A.; KARIMI, F.; JORSARAEI, S.G. Correlation of sperm parameters with semen lipid peroxidation and total antioxidants levels in astheno and oligoastheno teratospermic men. **Iranian Red Crescent Medical Journal**, [s. l.], v. 15, n. 9, p.780–785, 2013. DOI: 10.5812/ircmj.6409. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3929810/>. Acesso em: 17 jan. 2022.

INTASQUI, P.; CAMARGO, M.; DEL GIUDICE, P.T.; SPAINE, D.M.; CARVALHO, V.M.; CARDOZO, K.H.M.; CEDENHO, A.P.; BERTOLLA, R.P. Unraveling the sperm proteome and post-genomic pathways associated with sperm nuclear DNA fragmentation. **Gamete Biology**, [s. l.], v.30, p.1187-1202, 2013. DOI: 10.1007/s10815-013-0054-6. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3800528/>. Acesso em: 24 nov. 2022.

JENSEN, C.F.S.; OSTERGREN, P.; DUPREE, J.M.; OHL, D.A.; SONKSEN, J.; FODE, M. Varicocele and male infertility. **Nature Reviews Urology**, [s. l.], v. 14, n. p.523–533, 2017. DOI: 10.1038/nrurol.2017.98. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nrurol.2017.98>. Acesso em: 8 set. 2021.

JENSEN, T.K.; SWAN, S.; TOPPARI, N.J.J.; REDMON, B.; PUNAB, M.; DROBNIS, E.Z.; HAUGEN, T.B.; ZILAITIENE, B.; SPARKS, A.E.; IRVINE, D.S.; WANG, C.; PIERRE JOUANNET, CHARLENE et al. Alcohol and male reproductive health: a cross-sectional study of 8344 healthy men from Europe and the USA. **Human Reproduction**, [s. l.], v. 29, n. 8, p. 1801–1809, 2014. DOI: 10.1093/humrep/deu118. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4093992/>. Acesso em: 28 feb.2023.

JIMENEZ, T.; SÁNCHEZ, G.; WERTHEIMER, E.; BLANCO, G. Activity of the Na,K-ATPase alpha4 isoform is important for membrane potential, intracellular Ca²⁺, and pH to maintain motility in rat spermatozoa. **Reproduction**, [s. l.], v.139, n.5, p.835-45. DOI: 10.1530/REP-09-0495. Epub 2010 Feb 23. PMID: 20179187. Disponível em: <https://rep.bioscientifica.com/view/journals/rep/139/5/835.xml>. Acesso em: 5 oct. 2022.

JODAR, M.; SOLER-VENTURA, A.; OLIVA, R. Semen proteomics and male infertility. **Journal of Proteomics**, [s. l.], v. 162, p.125-134, 2017. DOI: 10.1016/j.jprot.2016.08.018. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1874391916303955?via%3Dihub>. Acesso em: 5 oct. 2022.

JUNGWIRTH, A.; GIWERCMAN, A.; TOURNAYE, H.; DIEMER, T.; KOPA, Z.; DOHLE, G.; KRAUSZ, C. European Association of Urology Guidelines on Male Infertility: The 2012 Update. **European Urology**, [s. l.], v. 62, n. 2, p. 324 – 332, 2012. DOI:

10.1016/j.eururo.2012.04.048. Disponível em:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0302283812005246?via%3Dihub>.
 Acesso em: 27 jan. 2023.

KANG, C.; PUNJANI, N.; LEE, R.K.; LI, P.S.; GOLDSTEIN, M. Effect of varicoceles on spermatogenesis. **Semin Cell Dev Biol**, [s. l.], v.121, pp. 114-124, 2022. DOI: 10.1016/j.semcdb.2021.04.005. Disponível em:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1084952121000781?via%3Dihub>
 Acesso em: 27 may. 2023.

KATIB, A. Mechanisms linking obesity to male infertility. **Central European journal of urology**, [s. l.], v. 68, n. 1, p. 79-85, 2015. DOI: 10.5173/ceju.2015.01.435. Disponível em:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4408383/>. Acesso em: 27 jul. 2022.

KATZ, D.J.; TELOKEN, P.; SHOSHANY, O. Male infertility - The other side of the equation. **Aust Fam Physician**, [s. l.], v. 46, n.9, p.641-646, 2017. PMID: 28892594. Disponível em: <https://www.racgp.org.au/afp/2017/september/male-infertility/>. Acesso em: 27 may. 2023.

KEKÄLÄINEN, J.; JOKINIEMI, A.; JANHUNEN, M.; HUUSKONEN, H. Offspring phenotype is shaped by the nonsperm fraction of semen. **J Evol Biol**, [s. l.], v. 33, n.5, p.584-594, 2020. DOI: 10.1111/jeb.13592. Disponível em:
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/jeb.13592> Acesso em: 27 may. 2023.

KOVAC, J.R.; PASTUSZAK, A.W.; LAMB, D.J. The use of genomics, proteomics, and metabolomics in identifying biomarkers of male infertility. **Fertil Steril**, [s. l.], v. 99, n.4, p. 998-1007, 2013. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2013.01.111. Disponível em:
[https://www.fertstert.org/article/S0015-0282\(13\)00167-2/fulltext](https://www.fertstert.org/article/S0015-0282(13)00167-2/fulltext). Acesso em: 21 aug. 2019.

KRUGER, T.F.; MENKVELD, R.; STANDER, F.S.; LOMBARD, C.J.; VAN DER MERWE, J.P.; VAN ZYL, J.A.; SMITH, K. Sperm morphologic features as a prognostic factor in in vitro fertilization. **Fertil Steril**, [s. l.], v.46, p.1118-1123, 1986. DOI: 10.1016/s0015-0282(16)49891-2. Disponível em:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0015028216498912?via%3Dihub>. Acesso: 31 jan.2022.

KRZASTEK, S.C.; SMITH, R. P.; KOVAC, J.R. Future diagnostics in male infertility: Genomics, epigenetics, metabolomics and proteomics. **Translational andrology and urology**, [s. l.], v. 9, Supl. 2, p. S195-S205, 2020. DOI: doi: 10.21037/tau.2019.10.20. Disponível em: <https://tau.amegroups.com/article/view/36740/28660>. Acesso em: 5 oct. 2022.

KUMAR, D. P.; SANGEETHA, N. Mitochondrial DNA mutations and male infertility. **Indian journal of human genetics**, [s. l.], v. 15, n. 3, p. 93-97, 2009. DOI: 10.4103/0971-6866.60183. Disponível em: <https://www.ijhg.com/article-0971-6866-2009-15-3-93-97-kumar/>. Acesso em: 17 jan. 2021.

LEISEGANG, K.; SENGUPTA, P.; AGARWAL, A.; HENKEL, R. Obesity and male infertility: Mechanisms and management. **Andrologia**, [s. l.], v. 53, n. 1, p. e13617, 2021. DOI: 10.1111/and.13617. Disponível em:
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/and.13617>. Acesso em: 27 apr. 2023.

LESLIE, S.W.; SOON-SUTTON, T.; KHAN, M.A.B. Male Infertility. *In*: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): **StatPearls Publishing**, 2023. PMID: 32965929. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK562258/>. Acesso em: 21 may. 2022.

LEVINE, H.; JØRGENSEN, N.; MARTINO-ANDRADE, A. MENDIOLA, J.; WEKSLER-DERRI, D.; MINDLIS, I.; PINOTTI, R.; SWAN, S.H. Temporal trends in sperm count: a systematic review and meta-regression analysis. **Human Reproduction Update**, [s. l.], v. 23, n.6, p.646-659, 2017. DOI: 10.1093/humupd/dmx021. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5850791/>. Acesso em: 9 set. 2021.

LOTTI, F.; FRIZZA, F.; BALERCIA, G.; BARBONETTI, A.; BEHRE, H.M.; CALOGERO, A.E. et al. (2020). The European academy of andrology (EAA) ultrasound study on healthy, fertile men: scrotal ultrasound reference ranges and associations with clinical, seminal, and biochemical characteristics. **Andrology**, [s. l.], v. 8, n.5, p. 1005–1020. DOI: 10.1111/andr.12951. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/andr.12951>. Acesso em: 27 may. 2023.

LOTTI, F; MAGGI, M. Sexual dysfunction and male infertility. **Nature Reviews Urology**, [s. l.], v. 15, n. 5, p.287-307, 2018. DOI: 10.1038/nrurol.2018.20. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nrurol.2018.20>. Acesso em: 8 set. 2021.

LOUIS, J.F.; THOMA, M.E.; SORENSEN, D.N.; MCLAIN, A.C.; KING, R.B.; SUNDARAM, R.; KEIDING, N.; BUCK-LOUIS, G.M. The prevalence of couple infertility in the United States from a male perspective: evidence from a nationally representative sample. **Andrologia**, [s. l.], v. 1, n.5, p. 741 – 748, 2013. DOI: 10.1111/j.2047-2927.2013.00110.x. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3752331/>. Acesso em: 19 jan. 2021.

MACHADO, J.P.N. Endocrinopatias e Infertilidade. Coimbra-Portugal. 2013. 60p. Dissertação (Mestrado) – **Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra**. Portugal, 2013. Disponível em: <https://www.uc.pt/fmuc/>. Acesso em: 5 apr.2022.

MAEGAWA, G.H.B.; CENTA, L.J. Aspectos genéticos do fator masculino na infertilidade. **Família, Saúde e Desenvolvimento**, [s. l.], v. 2, n. 1, p.7-12, 2000. Disponível: <https://revistas.ufpr.br/refased/article/download/4896/3736>. Acesso em: 13 jan. 2021.

MANCINI, M. C. et al. *In*: Tratado de obesidade. 2.ed. Rio de Janeiro. **Editora Guanabara Koogan**, 2015. Disponível em: https://www.academia.edu/50584199/Tratado_de_Obesidade_2a_edic_a_o. Acesso em: 27 may. 2023.

MARTINEZ, G.; DANIELS, K.; CHANDRA, A. Fertility of men and women aged 15-44 years in the United States: National Survey of Family Growth, 2011-2015. **Natl Health Stat Report**, [s. l.], v.11, n.113, p.1–29, 2018. PMID: 22803225. Disponível em: <chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcglclefindmkaj/https://www.cdc.gov/nchs/data/nhsr/nhsr051.pdf> Acesso em: 8 nov. 2021.

MASCARENHAS, M.N.; FLAXMAN, S.R.; BOERMA, T.; VANDERPOEL, S.; STEVENS, G.A. National, regional, and global trends in infertility prevalence since 1990: a systematic

analysis of 277 health surveys. **PLoS Med**, [s. l.], v.9, n.12, 2012. DOI: 10.1371/journal.pmed.1001356. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosmedicine/article?id=10.1371/journal.pmed.1001356>. Acesso em: 04 out. 2022.

MILARDI, D.; GRANDE, G.; VINCENZONI, F.; MESSANA, I.; PONTECORVI, A.; DE MARINIS, L.; CASTAGNOLA, M.; MARANA, R. Proteomic approach in the identification of fertility pattern in seminal plasma of fertile men. **Fertility and Sterility**, [s. l.], v. 97, n.1, p.67-73e1., 2012. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2011.10.013. Disponível em: [https://www.fertstert.org/article/S0015-0282\(11\)02679-3/fulltext](https://www.fertstert.org/article/S0015-0282(11)02679-3/fulltext). Acesso em: 21 jan. 2022.

MOURA, A. A.; CHAPMAN, D. A.; KILLIAN, G. J. Proteins of the accessory sex glands associated with the oocyte-penetrating capacity of cauda epididymal sperm from Holstein bulls of documented fertility. **Molecular Reproduction and Development**, Malden, [s. l.], v.74, p.214–222, 2006a. DOI: 10.1002/mrd.20590. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/mrd.20590>. Acesso em: 13 jun.2023.

MOURA, A. A.; KOC, H.; CHAPMAN, D. A.; KILLIAN GJ. Identification of accessory sex gland fluid proteins as related to fertility indexes of dairy bulls: a proteomic approach. **Journal of Andrology, Schaumburg**, [s. l.], v.27, p.201–211, 2006b. DOI: 10.1111/aji.12432. Disponível em: 10.2164/jandrol.05089. Acesso em: 13 jun. 2023.

MOURA, A.A.; ANDRADE, C.R.; SOUZA, C.E.A.; RÊGO, J.P.A.; MARTINS, J.A.M.; OLIVEIRA, E.B.S. Proteínas do plasma seminal, funções espermáticas e marcadores moleculares da fertilidade. **Rev. Bras. Reprod. Anim**, [s. l.], v.35, n.2, p.139-144, 2011. Disponível em: <http://www.cbra.org.br/>. Acesso em: 28 jan. 2021.

MOURA, A.A.; SOUZA, C.E.; STANLEY, B.A.; CHAPMAN, D.A.; KILLIAN, G.J. Proteomics of cauda epididymal fluid from mature Holstein bulls. **J Proteomics**, [s. l.], v.73, n.10, p. 2006-20, 2010. DOI: 10.1016/j.jprot.2010.06.005. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1874391910001831?via%3Dihub>. Acesso em: 15 jun.2023.

MOHAJAN, D.; MOHAJAN, H.K. Obesity and Its Related Diseases: A New Escalating Alarming in Global Health. **Journal of Innovations in Medical Research**, [s. l.], v.2, n.3, p. 12-23, 2023. Disponível em: <https://www.paradigmpress.org/jimr/article/view/505>. Acesso em: 15 mar.2023.

MURSHIDI, M.M.; CHOY, J.T.; EISENBERG, M.L. Male Infertility and Somatic Health. **The Urologic clinics of North America**, [s. l.], v.47, n.2, 211–217, 2020. DOI: 10.1016/j.ucl.2019.12.008. Disponível em: [https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0094-0143\(19\)30115-6](https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0094-0143(19)30115-6) Acesso em: 17 jan. 2023.

NENICU, A.; LUERS, G. H.; KOVACS, W.; DAVID, M.; ZIMMER, A.; BERGMANN, M.; BAUMGART-VOGT, E. Peroxisomes. In human and mouse testis: Differential expression of peroxisomal proteins in germ cells and distinct somatic cell types of the testis. **Biology of Reproduction**, [s. l.], v. 77, n. 6, p.1060–1072, 2007. DOI: 10.1095/biolreprod.107.061242. Disponível em: <https://academic.oup.com/biolreprod/article/77/6/1060/2629916?login=false>. Acesso em: 17 jan. 2022.

NOWICKA-BAUER, K.; SZYMCAK-CENDLAK, M. Structure and Function of Ion Channels Regulating Sperm Motility—An Overview. **Int. J. Mol. Sci**, [s. l.], v. 22, n.6, p. 1-24, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms22063259>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1422-0067/22/6/3259>. Acesso em: 15 jun.2023.

NUNES, D.C.; RIBEIRO, J.C.; ALVES, M.G.; OLIVEIRA, P.F.; BERNARDINO, R.L. Male Sex Hormones, Metabolic Syndrome, and Aquaporins: a triad of players in male (in) fertility. **International Journal Of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 24, n. 3, p. 1960, 2023. DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms24031960>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1422-0067/24/3/1960>. Acesso em: 27 mar. 2023.

OMOLAOYE, T.S.; OMOLAOYE, V.A.; KANDASAMY, R.K.; HACHIM, M.Y.; DU PLESSIS, S.S. Omics and Male Infertility: Highlighting the Application of Transcriptomic Data. **Life (Basel)**, [s. l.], v.12, n. 2, p. 280, 2022. DOI: 10.3390/life12020280. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8875138/>. Acesso em: 15 mar. 2023.

OKONOFUA, F.E.; NTOIMO, L.F.C.; OMONKHUA, A.; AYODEJI, O.; OLAFUSI, C.; UNUABONAH, E.; OHENHEN, V. Causes and Risk Factors for Male Infertility: A Scoping Review of Published Studies. **Int J Gen Med**, [s. l.], v.4, n.15, p. 5985-5997, 2022. DOI: 10.2147/IJGM.S363959. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9268217/> Acesso em: 18 mar. 2023.

PANNER SELVAM, M.K.; AGARWAL, A. Sperm and Seminal Plasma Proteomics: Molecular Changes Associated with Varicocele-Mediated Male Infertility. **World J Mens Health**, [s. l.], v. 38, n.4, p. 472-483, 2020. DOI: 10.5534/wjmh.190018. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7502311/>. Acesso em: 17 aug.2021.

PASTUSZAK, A.W.; WANG, R. Varicocele and testicular function. **Asian J Androl**, [s. l.], v.17, n.4, p. 659-67, 2015. DOI: 10.4103/1008-682X.153539. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4492060/>. Acesso em: 6 mar.2023.

PIATO, S. In: PIATO, SEBASTIÃO. **Tratado de Ginecologia**. São Paulo: Editora Artes Médicas Ltda, 1997. 1250p. ISBN: 8574040495.

PINTO, F.M.; ODRIÓZOLA, A.; CANDENAS, L.; SUBIRÁN, N. The Role of Sperm Membrane Potential and Ion Channels in Regulating Sperm Function. **Int. J. Mol. Sci**, [s. l.], v.24, n.8, p. 2-26, 2023. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms24086995>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1422-0067/24/8/6995>. Acesso em: 15 jun.2023.

PUGA MOLINA, L.C.; LUQUE, G.M.; BALESTRINI, P.A.; MARÍN-BRIGGILER, C.I.; ROMAROWSKI, A.; BUFFONE, M.G. Molecular Basis of Human Sperm Capacitation. **Front Cell Dev Biol**, [s. l.], v.27, n.;6, p. 1-22, 2018. DOI: 10.3389/fcell.2018.00072. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6078053/>. Acesso em: 15 jun.2023.

RAMOS, C.S.; PEDRA, Y.R.; SOUSA, A.R.; SANTOS, S.D.; CERQUEIRA, D.C.C.; LIMA, A.A.C. et al. Perfil epidemiológico de agravos urológicos em homens cisgêneros em município da Bahia, Brasil. **REVisa**, [s. l.], v. 10, n.1, p.82-93, 2021. Disponível em: <http://revistafacesa.senaaires.com.br/index.php/revisa/article/view/628>. Acesso: 10 jan. 2022.

RIBAS-MAYNOU, J.; YESTE, M. Oxidative Stress in Male Infertility: Causes, Effects in Assisted Reproductive Techniques, and Protective Support of Antioxidants. **Biology**, [s. l.], v. 9, n.4, p. 1-16, 2020. DOI: 10.3390/biology9040077. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7235998/>. Acesso em: 21 jan. 2022.

RITCHIE, C.; KO, E.Y. Oxidative stress in the pathophysiology of male infertility. **Andrologia**, [s. l.], v. 53, n. 1, p. e13581, 2021. DOI: 10.1111/and.13581. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/and.13581>. Acesso em: 23 feb. 2022.

ROBERTSON, S. A. Seminal plasma and male factor signalling in the female reproductive tract. **Cell Tissue Research**, [s. l.], v. 322, n. 1, p. 43-52, 2005. DOI: 10.1007/s00441-005-1127-3. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00441-005-1127-3>. Acesso em: 13 jun. 2023.

RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H.; KVIST, U.; ERNERUDH, J.; SANZ, L.; CALVETE, J.J. Seminal plasma proteins: what role do they play? **Am J Reprod Immunol**, [s. l.], v. 66, Suppl 1, p.11-22, 2011. DOI: 10.1111/j.1600-0897.2011.01033.x. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1600-0897.2011.01033.x> Acesso em: 25 nov.2022.

RODRIGUEZ-MARTINEZ, H.; MARTINEZ, E.A.; CALVETE, J.J.; PEÑA VEJA, F.J.; ROCA, J. Seminal Plasma: Relevant for Fertility? **Int J Mol Sci**, [s. l.], v.22, n.9, p.1-28, 2021. DOI: 10.3390/ijms22094368. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8122421/>. Acesso em: 13 may.2023.

SAHLÉN, G.; NILSSON, O.; LARSSON, A.; CARLSSON, L.; NORLÉN, B.J.; RONQUIST, G. Secretions from seminal vesicles lack characteristic markers for prostasomes. **Ups J Med Sci**, [s. l.], v.115, n 2, p. 107-12. DOI: 10.3109/03009730903366067. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2853787/>. Acesso em: 15 jun.2023.

SAMANTA, L.; PARIDA, R.; DIAS, T. R.; AGARWAL, A. The enigmatic seminal plasma: a proteomics insight from ejaculation to fertilization. **Reproductive biology and endocrinology: RB&E**, [s. l.], v.16, n.1, p.1-11, 2018. DOI: 10.1186/s12958-018-0358-6. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5923003/>. Acesso em: 20 mar. 2019.

SAMPLASKI, M.K.; NANGIA, A.K. Adverse effects of common medications on male fertility. **Nat Rev Urol**, [s. l.], v. 12, n.7, p. 401–413, 2015. DOI: 10.1038/nrurol.2015.145. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nrurol.2015.145>. Acesso em: 8 set. 2021.

SANTOS, I. S.; UGÁ, M. A. D.; PORTOS, M. The public-private mix in the brazilian health system: financing, delivery and utilization of health services. **Ciência e Saúde Coletiva**, [s. l.], v. 13, n. 5, p. 1431- 1440, 2008. DOI: 10.1590/s1413-81232008000500009. Disponível em: Acesso em: 24 jan.2022.

SCHNEIDER, M. et al. Mitochondrial glutathione peroxidase 4 disruption causes male infertility. **The FASEB journal**, [s. l.], v. 23, n. 9, p. 3233-3242, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1096/fj.09-132795>. Disponível em: <https://faseb.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1096/fj.09-132795>. Acesso em: 27 may.2023.

SCHUPPE, H.C.; PILATZ, A.; HOSSAIN, H.; DIEMER, T.; WAGENLEHNER, F.; WEIDNER, W. Urogenital Infection as a Risk Factor for Male Infertility. **Dtsch Arztebl International**, [s. l.], v. 114, n. 19, p.339-346, 2017. DOI: 10.3238/arztebl.2017.0339. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5470348/>. Acesso em: 15 may. 2021.

SEELEY, R. R.; STEPHENS, T. D.; TATE, P. Reproduction System. In: Essentials of anatomy and physiology, Philadelphia, PA, 9 ed. p. 529-559, 2016: **The McGraw-Hills Companies**. ISBN: 0071102108, 9780071102100. Disponível em: https://books.google.com.br/books/about/Anatomy_Physiology.html?id=KizQswEACAAJ&redir_esc=y. Acesso em: 27 may. 2023.

SELVARAJ, K.; RAVICHANDRAN, S.; KRISHNAN, S.; RADHAKRISHNAN, R.K.; MANICKAM, N.; KANDASAMY, M. Testicular Atrophy and Hypothalamic Pathology in COVID-19: Possibility of the Incidence of Male Infertility and HPG Axis Abnormalities. **Reprod Sci**, [s. l.], v. 28, n.10, p.2735-2742, 2021. DOI: 10.1007/s43032-020-00441-x. Disponível em: Acesso em: 27 may. 2023.

SHARMA, R.; AGARWAL, A.; MOHANTY, G.; HAMADA, A.J.; GOPALAN, B.; WILLARD, B.; YADAV, S.; DU PLESSIS, S. Proteomic analysis of human spermatozoa proteins with oxidative stress. **Reproductive Biology and Endocrinology**, [s. l.], v.11, n.48, p2-18, 2013. DOI: 10.1186/1477-7827-11-48. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3716960/>. Acesso em: 14 oct. 2022.

SHARON, N.; LIS, H. History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. **Glycobiology**, [s. l.], v. 14, n. 11, p. 53R-62R, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1093/glycob/cwh122>. Disponível em: <https://academic.oup.com/glycob/article/14/11/53R/627369?login=false>. Acesso em: 13 jun. 2023.

SILVA, J.S.A; UTIYAWA, S.R.R. Main autoantibodies involved in female and male infertility, emphasizing the clinical and laboratorial aspects. **RBAC**, [s. l.], v. 37, n. 4, p.233-238, 2005. ISSN: 2448-3877. Disponível em: <https://www.rbac.org.br/>. Acesso em: 20 jan. 2021.

SOUSA, A.R. Produzir cuidado à saúde de homens e suas masculinidades: uma prioridade. **REVISA**, [s. l.], v. 9, n.4, p.681-684, 2020. Disponível em: <http://revistafacesa.senaaires.com.br/index.php/revisa/article/view/628>. Acesso: 10 jan. 2022.

STARITA-GERIBALDI, M.; POGGIOLI, S.; ZUCCHINI, M.; GARIN, J.; CHEVALLIER, D.; FENICHEL, P.; POINTS, G. Mapping of seminal plasma proteins by two-dimensional gel electrophoresis in men with normal and impaired spermatogenesis. **Mol Hum Reprod**, [s. l.], v. 7, n.8 p.715- 722, 2001. DOI: 10.1093/molehr/7.8.715. Disponível em: <https://academic.oup.com/molehr/article/7/8/715/1031687?login=false>. Acesso em: 25 jan. 2021.

STARITA-GERIBALDI, M.; ROUX, F.; GARIN, J.; CHEVALLIER, D.; FÉNICHEL, P.; POINTIS, G. Development of narrow immobilized pH gradients covering one pH unit for human seminal plasma proteomic analysis. **Proteomics**, [s. l.], v.3, n. 8, p.1611-9, 2003. DOI: 10.1002/pmic.200300493. Disponível em:

<https://analyticalsciencejournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/pmic.200300493>
Acesso em: 25 jan. 2021.

TAKESHIMA, T.; YUMURA, Y.; YASUDA, K. SANJO, H.; KURODA, S.; YAMANAKA, H.; IWASAKI, A. Inverse correlation between reactive oxygen species in unwashed semen and sperm motion parameters as measured by a computer-assisted semen analyzer. **Asian J Androl**, [s. l.], v. 19, n. 3, p.350-354, 2017. DOI: 10.4103/1008-682X.173933. Disponível em: <https://journals.lww.com/ajandrology/pages/default.aspx>. Acesso em: 16 apr. 2021.

TEIXEIRA, M.Y.P.; CUNHA, L.M.S.C.P.; DA COSTA, A.L.E.; TORQUATO-FILHO, S.E.; MACHADO, S.P.; MAIA, C.S.C. Lifestyle components associated with male infertility. **Nutr. clín. diet. Hosp**, [s. l.], v. 38, n.3, p.179-184, 2018. ID: ibc-175596. Disponível em: <https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/ibc-175596>. Acesso em: 27 mar.2023.

THORUP, J.; MCLACHLAN, R.; CORTES, D.; NATION, T.R.; BALIC, A.; SOUTHWELL, B.R., HUTSON, J.M. What is new in cryptorchidism and hypospadias—a critical review on the testicular dysgenesis hypothesis. **Journal of Pediatric Surgery**, [s. l.], v. 45, n.10, p. 2074–2086, 2010. DOI: 10.1016/j.jpedsurg.2010.07.030. Disponível em: [https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022-3468\(10\)00617-2](https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022-3468(10)00617-2). Acesso em: 15 may. 2021.

TÜRK, S.; MÄNDAR, R.; MAHLAPUU, R.; VIITAK, A.; PUNAB, M.; KULLISAAR, T. Male infertility: Decreased levels of selenium, zinc and antioxidants. **J Trace Elem Med Biol**, [s. l.], v.28, n.2, p.179-185, 2014. DOI: 10.1016/j.jtemb.2013.12.005. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0946672X1300206X?via%3Dihub>. Acesso em: 24 sep. 2022.

TURUNEN, T.; MAGRIS, M.; MALINEN, M.; KEKÄLÄINEN, J. Seminal-Plasma-Mediated Effects on Sperm Performance in Humans. **Cells**, [s. l.], v.11, n.14, p.4-16, 2022. DOI: 10.3390/cells11142147. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9322865/>. Acesso em: 12 feb. 2023.

VAN DER HORST, H.J.; DE WALL, L.L. Hypospadias, all there is to know. **Eur J Pediatr**, [s. l.], v. 4., n.176, p.435-441, 2017. DOI: 0.1007/s00431-017-2864-5. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5352742/>. Acesso em: 15 may. 2021.

VIREQUE, A.A.; TATA, A.; SILVA, O.F.; LOTURCO, E.G.; AZZOLINI, A.; FERREIRA, C.R.; DANTAS, M.H.; FERRIANI, R.A.; REIS, R.M. Effects of n-6 and n-3 polyunsaturated acid-rich soybean phosphatidylcholine on membrane lipid profile and cryotolerance of human sperm. **Fertil Steril**, [s. l.], v.106, n. 2, p.273-283, 2016. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2016.03.044. Disponível em: [https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0015-0282\(16\)61051-8](https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0015-0282(16)61051-8). Acesso em: 27 jan. 2022.

WANG, J.; WANG, J.; ZHANG, H.; SHI, H.; MA, D.; ZHAO, H.; LIN, B.; LI, R. Proteomic analysis of seminal plasma from asthenozoospermia patients reveals proteins that affect oxidative stress responses and semen quality. **Asian journal of andrology**, [s. l.], v. 11, n. 4, p. 484-491, 2009. DOI: 10.1038/aja.2009.26. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3735302/>. Acesso em: 25 jan. 2021.

WILKINS, M. R.; WILLIAMS, K. L.; APPEL, R. D.; HOCHSTRASSER, D. Proteome research: new frontiers in functional genomics. **Germany: Springer-Verlag**, 1997. p 243.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Infertility, **Net**, [s. l.], 2018. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/infertility>. Acesso em: 27 mar.2022.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Global perspective Human stories. 2023. Geneva: **World Health Organization**. Disponível em: <https://news.un.org/en/story/2023/04/1135312>. Acesso em: 21 may. 2023.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Laboratory manual for the examination and processing of human semen. 6th ed. Geneva, Switzerland: **World Health Organization**. 2021a. 292p. Disponível em: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/44261>. Acesso em: 10 out. 2020.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Obesity and overweight. Net, 2021b. **World Health Organization**. Disponível em: <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>. Acesso em: 12 jun. 2023.

ZADEH, A.; ARAB, D. COVID-19 and male reproductive system: pathogenic features and possible mechanisms. **J Mol Histol**, [s. l.], v.52, n.5, p.869-878, 2021. DOI: 10.1007/s10735-021-10003-3. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8260577/>. Acesso em: 25 may. 2023.

ZEGERS-HOCHSCHILD, F.; ADAMSON, G.D.; DYER, S., RACOWSKY, C.; DE MOUZON, J.; SOKOL, R.; RIENZI, L.; SUNDE, A.; SCHMIDT, L.; COOKE, I.D.; SIMPSON, J.L.; VAN DER POEL S. The International Glossary on Infertility and Fertility Care, 2017. **Fertil Steril**, [s. l.], v.108, n.3, p.393-406, 2017. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2017.06.005. Disponível em: [https://www.fertstert.org/article/S0015-0282\(17\)30429-6/fulltext](https://www.fertstert.org/article/S0015-0282(17)30429-6/fulltext). Acesso em: 04 out. 2022.

ZORZI, P.M.; KUSSLER, A.P.S.; PIMENTEL, A.M.; CAPP, E.; CORLETA, H.V.E. Semen Analysis of Total Motile Sperm Count Based on the 1999 and 2010 WHO Criteria. **JBRA Assisted Reproduction**, [s. l.], v. 26, n.2, p.261-266, 2022. DOI: 10.5935/1518-0557.20210066. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9118975/>. Acesso em: 26 jan. 2021.

ZYLBERSZTEJN, D.S.; ANDREONI, C.; DEL GIUDICE, P.T.; SPAINE, D.M.; BORSARI, L.; SOUZA, G.H.M. F.; BERTOLLA, R.P.; FRAIETTA, R. Proteomic analysis of seminal plasma in adolescents with and without varicocele. **Fertil Steril**, [s. l.], v. 99, p, n.1, p.92-8, 2013. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2012.08.048. Disponível em: [https://www.fertstert.org/article/S0015-0282\(12\)02136-X/fulltext](https://www.fertstert.org/article/S0015-0282(12)02136-X/fulltext). Acesso em: 4 may. 2023.

APÊNDICE A – FOLDER EXPLICATIVO DA PESQUISA

Dicas nutricionais e de saúde

- ✚ Monitore seu peso e sua pressão arterial.
- ✚ Evite o consumo exagerado de carboidratos simples (açúcar).
- ✚ Evite o consumo de alimentos industrializados.
- ✚ Evite o consumo de embutidos, enlatados e temperos prontos.
- ✚ Evite o consumo de preparações congeladas, margarina com sal.
- ✚ Aumente o consumo de fibras alimentares.
- ✚ Mantenha-se hidratado durante todo o dia.
- ✚ Faça atividade física.
- ✚ Durma bem.



Pesquisadora: Luana Mara Silva de Castro Pacheco da Cunha
(85) 9.8872-2815
e-mail: fertilidademasculina@gmail.com

Apoio



Caracterização Proteômica de Plasma Seminal e Espermatozoides de Homens como Estratégia para Identificação de Biomarcadores para Diagnóstico da Fertilidade Masculina



Você sabia que a infertilidade masculina representa 50% dos casos de infertilidade sendo considerado um problema de saúde pública? E mesmo com parâmetros seminais normais, pode estar presente?

No sentido de colaborar com os estudos recentes na área de reprodução humana, você está sendo convidado a participar da pesquisa

Caracterização Proteômica de Plasma Seminal e Espermatozoides de Homens como Estratégia para Identificação de

Biomarcadores para Diagnóstico da Fertilidade Masculina com objetivo de investigar técnicas para melhorar o diagnóstico e tratamento precoce da infertilidade masculina.

No Ceará, essa pesquisa é pioneira e está sendo realizada em parceria com o

Centro de Reprodução Humana

Evangelista Torquato e a BIOS – Centro de Medicina Reprodutiva.

Para participar, é necessário ter entre 18 a 60 anos e manifestar o desejo de ceder o sêmen excedente que seria

descartado após a análise. Assim, na data e horário da coleta, agendados por você, diretamente na BIOS, o sêmen excedente será destinado para essa pesquisa. Neste sentido, gostaríamos de saber se você deseja ceder o material excedente e colaborar com as pesquisas sobre a fertilidade masculina.

Reforçamos que todas as informações serão mantidas em absoluto sigilo e que após a conclusão da pesquisa você terá acesso aos resultados.

Agradecemos a sua participação!

v.11. Histórico de doenças na família: 1.(☐) Obesidade 2.(☐) Diabetes 3.(☐) Hipertensão 4.(☐) Cardíaca 5.(☐) Câncer 6.(☐) Outro: _____	v.11
v.12. Alguma doença diagnosticada: 1.(☐) Sim 2.(☐) Não Se sim, qual/quais: _____	v.12
v.13. Medicamentos em uso: 1.(☐) Sim 2.(☐) Não Se sim, qual/quais _____	v.13
v.14. Suplemento vitamínico/mineral em uso: 1.(☐) Sim 2.(☐) Não Se sim, qual/quais: _____	v.14
v.15. Prática de atividade física: 1. (☐) Não pratico 2. (☐) 1 a 2x/semana 3. (☐) 3 a 4x/semana 4. (☐) Mais do que 5x/semana Se sim, qual atividade física? _____	v.15
v.16. Tempo que você e sua parceira desejam engravidar sem nenhum tipo de tratamento 1. (☐) Menos de 6 meses 2. (☐) Entre 6 meses e 1 ano 3. (☐) Entre 1 a 3 anos 4. (☐) Acima de 4 anos	v.16
v.17 Já fez espermograma? 1.(☐) Sim 2.(☐) Não Se sim, quanto tempo? _____	v.17
v.18. Fez/faz algum tratamento em reprodução humana? 1.(☐) Sim 2.(☐) Não	v.18
v.19. Se sim, qual o tratamento? 1.(☐) IIU (Inseminação Intrauterina) 2.(☐) FIV (Fertilização In Vitro) 3. (☐) ISCI (Injeção Intracitoplasmática de Espermatozoide) 4. (☐) Relação sexual ou Coito programado 5. (☐) Indução da ovulação 6. (☐) Gravidez com gametas ou embrião doados	v.19
v.20. Se sim, quantas vezes tentou? 1. (☐) IIU (Inseminação Intrauterina) 2. (☐) FIV (Fertilização In Vitro) 3. (☐) ISCI (Injeção Intracitoplasmática de Espermatozoide) 4. (☐) Relação sexual ou Coito programado 5. (☐) Indução da ovulação 6. (☐) Gravidez com gametas ou embrião doados	v.20

FORMULÁRIO DE DADOS ANTROPOMÉTRICOS

v.21. Peso (kg): _____	v.21
v.22. Altura (m): _____	v.22
v.23. IMC (kg/m ²): _____	v.23
v.24. Classificação nutricional: 1. () Desnutrição (IMC<18,5) 2. () Eutrofia (18,5<IMC<24,9) 3. () Sobrepeso (25<IMC<29,9) 4. () Obesidade grau I (30<IMC<34,9) 5. () Obesidade grau II (35<IMC<39,9) 6. () Obesidade grau III (IMC>40)	v.24
v.25. Circunferência da cintura (cm): _____	v.25

EXAMES BIOQUÍMICOS (Pegar direto no prontuário ou caso o participante tiver os exames, anotar)

v.26. Testosterona total _____	v.26
v.27. Testosterona livre _____	v.27
v.28. FSH _____	v.28
v.29. LH _____	v.29
v.30. Estradiol _____	v.30
v.31. Hemograma _____	v.31
v.32. Prolactina _____	v.32
v.33. TSH _____	v.33

ANEXO A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO****FUNDAÇÃO EDSON QUEIROZ****UNIVERSIDADE DE FORTALEZA****TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

TÍTULO DA PESQUISA: Caracterização Proteômica de Plasma Seminal e Espermatozoides de Homens como Estratégia para Identificação de Biomarcadores para Diagnóstico da Fertilidade Masculina.

NOME DO PESQUISADOR: Luana Mara Silva de Castro Pacheco da Cunha

ENDEREÇO: Av. Washington Soares, 1321 – Edson Queiroz

TELEFONE: (85) 98872-2815

Prezado Participante,

Você está sendo convidado a participar desta pesquisa desenvolvida por Luana Mara Silva de Castro Pacheco da Cunha que se baseia na caracterização proteômica de plasma seminal e espermatozoides como uma ferramenta para identificação de proteínas que possam ser utilizadas como biomarcadores no diagnóstico e tratamento precoce da infertilidade masculina.

1. POR QUE VOCÊ ESTÁ SENDO CONVIDADO A PARTICIPAR?

O convite para a sua participação se deve ao fato de você ter procurado o Centro de Reprodução Humana Evangelista Torquato, uma clínica de reprodução humana para investigação da sua fertilidade, local onde será realizada essa pesquisa.

2. COMO SERÁ A MINHA PARTICIPAÇÃO?

Ao participar desta pesquisa você autorizará a doação de 20µL de sêmen fresco no momento de seu exame chamado espermograma que foi solicitado pelo médico especialista no processo de investigação clínica que será realizado na BIOS – Centro de Medicina Reprodutiva em Fortaleza-Ce. No dia dessa coleta do sêmen, o Sr. receberá instruções da clínica sobre os procedimentos a serem adotados para a coleta do sêmen. Caso um desses episódios tenha ocorrido, favor registrar no formulário recebido no dia da coleta.

3. QUEM SABERÁ SE EU DECIDIR PARTICIPAR?

Somente o pesquisador responsável e sua equipe saberá que você está participando desta pesquisa. Ninguém mais saberá da sua participação. Entretanto, caso você deseje que o seu nome ou o nome da sua instituição conste do trabalho final, nós respeitaremos sua decisão. Basta que você marque ao final deste termo a sua opção.

4. GARANTIA DA CONFIDENCIALIDADE E PRIVACIDADE.

Todos os dados e informações que você nos fornecer serão guardados de forma sigilosa. Garantimos a confidencialidade e a privacidade dos seus dados e das suas informações. Tudo que o Sr. nos fornecer ou que sejam conseguidos através do seu prontuário serão utilizados somente para esta pesquisa. O material da pesquisa, com os seus dados e informações será armazenado em local seguro e guardados em arquivo, por pelo menos cinco anos após o término da pesquisa. Qualquer dado que possa identificá-lo será omitido na divulgação dos resultados da pesquisa.

5. EXISTE ALGUM RISCO SE EU PARTICIPAR?

Esta pesquisa é considerada de risco mínimo. Como se trata de um procedimento de investigação da sua fertilidade, o Sr. terá que realizar o exame chamado espermograma prescrito pelo médico especialista. Por se tratar de um exame de coleta e análise laboratorial, o espermograma não envolve complicações. O risco/desconforto a ser considerado está relacionado ao constrangimento, inquietação ou dúvidas sobre a coleta do sêmen. Para isso, o Sr. será orientado pelo médico especialista como proceder corretamente o exame, sendo encaminhado a BIOS – Centro de Medicina Reprodutiva que dispõe de uma estrutura física adequada para garantir a sua tranquilidade durante o momento da coleta e pessoal treinado para realizar os esclarecimentos necessários. O sêmen será coletado em frasco estéril e descartável e analisado pela clínica. Com o seu consentimento, após a análise do sêmen pela clínica, esse material será centrifugado para a separação do plasma seminal e espermatozoide. Em seguida será congelado para avaliação proteômica conforme descrito na pesquisa. Reforçamos que essas amostras não serão armazenadas para a realização de

pesquisas futuras. No mesmo dia da coleta do sêmen, serão feitas medidas de peso, altura e circunferência da cintura. Esse procedimento não apresentará nenhum risco/desconforto a sua saúde.

Os pesquisadores garantirão o sigilo das informações e adotarão medidas de monitoramento da coleta de dados e proteção à confidencialidade. Tais medidas são: o participante não será identificado pelo seu nome, não serão usadas características físicas que possam levar outras pessoas a identifica-los e durante a coleta de dados, os pesquisadores serão monitorados pela clínica, evitando assim vazamento de dados. Serão utilizadas as iniciais dos nomes, garantindo assim a completa discrição e mantendo a identidade dos participantes anônimos e as informações obtidas, como os dados coletados em completo sigilo.

6. EXISTE ALGUM BENEFÍCIO SE EU PARTICIPAR?

Os benefícios esperados com a pesquisa são no sentido de aprimoramento dos conhecimentos sobre reprodução assistida na proteômica como ferramenta para identificação das proteínas, identificando que possam ser utilizadas como biomarcadores no diagnóstico e tratamento precoce da infertilidade masculina. Portanto, o presente estudo representará significativo avanço para a compreensão dos fatores que causam a infertilidade masculina.

7. FORMAS DE ASSISTÊNCIA E RESSARCIMENTO DAS DESPESAS.

Os esclarecimentos da pesquisa serão realizados na clínica onde o Sr. está sendo acompanhado na investigação clínica da sua fertilidade. Caso o Sr. aceite em participar da pesquisa, não terá nenhum custo ou quaisquer compensações financeiras.

8. ESCLARECIMENTOS

Caso você tiver alguma dúvida a respeito da pesquisa e/ou dos métodos utilizados na mesma, pode procurar a qualquer momento o pesquisador responsável.

Nome do pesquisador responsável: Luana Mara Silva de Castro Pacheco da Cunha

Endereço: Av. Washington Soares, 1321 – Edson Queiroz

Telefone para contato: (85) 98872-2815

Horário de atendimento: 2 a 6ª. (14:00 as 18:00h)

Caso o Sr. desejar obter informações sobre os seus direitos e os aspectos éticos envolvidos na pesquisa, poderá consultar o Comitê de Ética da Universidade de Fortaleza. O Comitê de Ética tem como finalidade defender os interesses dos participantes da pesquisa em sua integridade e dignidade e tem o papel de avaliar e monitorar o andamento do projeto, de modo que a pesquisa respeite os princípios éticos de proteção aos direitos humanos, da dignidade, da autonomia, da não maleficência, da confidencialidade e da privacidade.

Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Universidade de Fortaleza – COÉTICA situada na Av. Washington Soares, 1321, Bloco M, Sala da Diretoria de Pesquisa e Desenvolvimento e Inovação. Bairro Edson Queiroz, CEP 60811-341. Telefone (85) 3477-3122, Fortaleza, CE.

9. CONCORDÂNCIA NA PARTICIPAÇÃO

Caso o Sr. estiver de acordo em participar da pesquisa deve preencher e assinar este documento que será elaborado em duas vias: uma via deste Termo ficará com o Senhor e a outra ficará com o pesquisador.

O participante de pesquisa ou seu representante legal, quando for o caso, deve rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE, apondo a sua assinatura na última página do referido Termo.

O pesquisador responsável deve da mesma forma, rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE, apondo sua assinatura na última página do referido Termo.

10. USO DE VOZ E/OU IMAGEM

Caso o Senhor deseje que seu nome, seu rosto, sua voz ou o nome da sua instituição apareça nos resultados da pesquisa, sem serem anonimizados, marque um dos itens abaixo.

- ☐ Eu desejo que o meu nome conste do trabalho final.
- ☐ Eu desejo que o meu rosto/face conste do trabalho final.
- ☐ Eu desejo que a minha voz conste do trabalho final.
- ☐ Eu desejo que o nome da minha instituição conste do trabalho final.

11. CONSENTIMENTO

Pelo presente instrumento que atende às exigências legais, o Sr. _____, portador da cédula de identidade _____, declara que, após leitura minuciosa do TCLE, teve oportunidade de fazer perguntas e esclarecer dúvidas que foram devidamente explicadas pelos pesquisadores. Ciente dos serviços e procedimentos aos quais será submetido e, não restando quaisquer dúvidas a respeito do lido e explicado, firma seu CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO em participar voluntariamente desta pesquisa.

E, por estar de acordo, assina o presente termo.

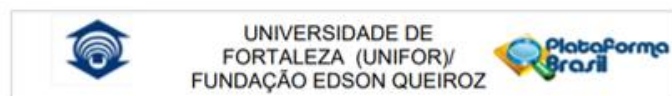
Fortaleza, _____ de _____ de _____.

Assinatura do participante ou representante legal

Assinatura do Pesquisador

Impressão dactiloscópica

ANEXO B – PARECER CONSUBSTANCIADO DO COMITÊ DE ÉTICA E PESQUISA



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Caracterização Proteômica de Plasma Seminal e Espermatozoides de Homens como Estratégia para Identificação de Biomarcadores para Diagnóstico da Fertilidade Masculina

Pesquisador: LUANA MARA SILVA DE CASTRO PACHECO DA CUNHA

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

Versão: 2

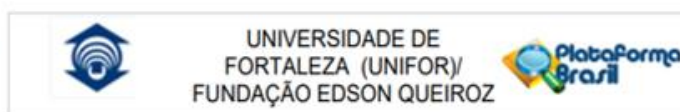
CAAE: 02451618.3.0000.5052

Instituição Proponente: Fundação Edson Queiroz

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.049.665



Continuação do Parecer: 3.049.665

Folha de Rosto	FOLHADEROSTOPROTEOMICA.pdf	07/11/2018 00:16:05	LUANA MARA SILVA DE CASTRO PACHECO DA CUNHA	Aceito
----------------	----------------------------	------------------------	--	--------

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

FORTALEZA, 30 de Novembro de 2018

Assinado por:
ALDO ANGELIM DIAS
(Coordenador(a))

ANEXO C – CARTA DE ANUÊNCIA DA BIOS – CENTRO DE MEDICINA REPRODUTIVA



BIOS
CENTRO DE MEDICINA REPRODUTIVA

18
ANOS

CARTA DE ANUÊNCIA

Aceito a doutoranda *Luana Mara Silva de Castro Pacheco da Cunha* da Rede Nordeste de Biotecnologia RENORBIO, da Universidade Federal do Ceará, a desenvolver sua pesquisa intitulada *Caracterização Proteômica de Plasma Seminal e Espermatozoides de Homens como Estratégia para Identificação de Biomarcadores para Diagnóstico da Fertilidade Masculina* sob a orientação do Professor Dr. Arlindo de Alencar Araripe Moura com os participantes da BIOS – Centro de Medicina Reprodutiva.

Ciente dos objetivos e metodologia da pesquisa acima citada, e que me são assegurados os requisitos abaixo:

- O cumprimento das determinações éticas da Resolução 466/2012 CNS/MS;
- A garantia de solicitar e receber esclarecimentos antes, durante e depois do desenvolvimento da pesquisa;
- Não haverá nenhuma despesa para esta instituição que seja decorrente da participação dessa pesquisa;
- No caso do não cumprimento dos itens acima, a liberdade de retirar minha anuência a qualquer momento da pesquisa sem penalização alguma, concorda em fornecer todos os subsídios para seu desenvolvimento.

Evangelista Torquato
Reprodução Humana
CRM 5686
CBO 449.737.583-1A

Fortaleza, 06 de novembro de 2018.

Dr. Evangelista Torquato

Diretor Técnico da BIOS – Centro de Medicina Reprodutiva

Rua Henriqueta Galeno, 501 - Dionísio Torres
CEP: 60135-420 - Fortaleza - CE
Tel.: (85) 4012.6364 - www.bios.med.br

ANEXO D – CARTA DE ANUÊNCIA DO CENTRO DE REPRODUÇÃO HUMANA EVANGELISTA TORQUATO

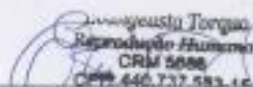
CARTA DE ANUÊNCIA

Aceito a doutoranda *Luana Mara Silva de Castro Pacheco da Cunha* da Rede Nordeste de Biotecnologia RENORBIO, da Universidade Federal do Ceará, a desenvolver sua pesquisa intitulada *Caracterização Proteômica de Plasma Seminal e Espermatozoides de Homens como Estratégia para Identificação de Biomarcadores para Diagnóstico da Fertilidade Masculina* sob a orientação do Professor Dr. Arlindo de Alencar Araripe Moura com os participantes do Centro de Reprodução Humana Evangelista Torquato.

Ciente dos objetivos e metodologia da pesquisa acima citada, e que me são assegurados os requisitos abaixo:

- O cumprimento das determinações éticas da Resolução 466/2012 CNS/MS,
- A garantia de solicitar e receber esclarecimentos antes, durante e depois do desenvolvimento da pesquisa,
- Não haverá nenhuma despesa para esta instituição que seja decorrente da participação dessa pesquisa,
- No caso do não cumprimento dos itens acima, a liberdade de retirar minha anuência a qualquer momento da pesquisa sem penalização alguma, concorda em fornecer todos os subsídios para seu desenvolvimento.

Fortaleza, 13 de setembro de 2018.


Sebastião Evangelista Torquato
CRM 5088
CPF 640.737.583-12

Dr. Sebastião Evangelista Torquato Filho

Diretor do Centro de Reprodução Humana Evangelista Torquato

ANEXO E – FICHA DE COLETA SEMINAL DA BIOS – CENTRO DE MEDICINA REPRODUTIVA



Nome do Marido: _____ Idade _____

Nome da Esposa: _____ Idade _____

Data de Nascimento (marido): ____/____/____ Hora do termino da coleta ____:____

Telefones da Resid. _____ /cel _____ Médico: _____

E-mail: _____ Data da coleta ____/____/____

Motivo da Coleta:

Espermograma Simples (), Espermograma Capacitação (), Frag DNA (), IIU (), FIV (), Congelamento ()

Campo a ser preenchido pelo paciente:

Antes da Coleta :

Qual foi a data da última ejaculação: ____/____/____

Teve febre nos últimos três meses? Sim () Não ()

Está tomando algum medicamento Sim () Não () Qual? _____

Tem corrimento pela uretra? Sim () Não ()

Após a coleta

Houve perda de sêmen? Sim () Não ()

A perda de sêmen foi da primeira parte ou da parte final? Primeira () Parte final ()

Recomendações:

- *Lembre-se de fazer a assepsia antes do procedimento com sabão (neutro) indicado pela clínica*
- *Não use saliva ou outro lubrificante para a coleta, apenas soro fisiológico.*
- *Antes da coleta, esvazie completamente a bexiga.*
- *Logo após a coleta deixe o frasco sobre a placa aquecida, e ao sair avise a secretária que finalizou o procedimento.*

Autorização:

Eu, _____ sou responsável pela amostra de sêmen que aqui deixo identificada. Estou ciente das informações contidas nesta ficha e autorizo a equipe da BIOS a manipular a minha amostra seguindo o procedimento acima descrito para meu benefício próprio. Autorizo ainda a utilização destes resultados para publicação de trabalhos científicos realizados nesta instituição, anonimamente.

Assinatura do paciente