

Larissa Berloff Belardin

**VALIDAÇÃO DE UM PAINEL DE BIOMARCADORES PROTEICOS NO
PLASMA SEMINAL DE ADOLESCENTES COM E SEM VARICOCELE**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de São Paulo –
Escola Paulista de Medicina, para
obtenção do Título de Mestre em
Ciências, pelo Programa de Pós-
graduação em Urologia.

SÃO PAULO

2016

Larissa Berloff Belardin

**VALIDAÇÃO DE UM PAINEL DE BIOMARCADORES PROTEICOS NO
PLASMA SEMINAL DE ADOLESCENTES COM E SEM VARICOCELE**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de São Paulo –
Escola Paulista de Medicina, para
obtenção do Título de Mestre em
Ciências, pelo Programa de Pós-
graduação em Urologia.

Orientador: Prof. Dr. Agnaldo Pereira
Cedenho.

Coorientador: Prof. Dr. Ricardo
Pimenta Bertolla.

SÃO PAULO

2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO
ESCOLA PAULISTA DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE CIRURGIA
DISCIPLINA DE UROLOGIA

Chefe do Departamento: Prof. Dr. José Luiz Martins

Chefe da Disciplina: Prof. Dr. Agnaldo Pereira Cedenho

Coordenador do Curso de Pós-graduação: Prof. Dr. Agnaldo Pereira Cedenho

Dedicatória

Aos meus pais **Tereza Fruchi Berloffa Belardin e Daniel Belardin**, e ao meu irmão **Gabriel Berloffa Belardin**, por sempre me apoiarem em todas as minhas decisões, por me incentivarem a continuar sonhando e realizando meus sonhos.

Ao meu noivo **Leonardo Di Schiavi Trotta** por sempre estar ao meu lado em todos os momentos, sempre com muita amizade, paciência e amor.

Agradecimentos

Ao **Prof. Dr. Agnaldo Pereira Cedenho**, por me orientar durante todo o meu mestrado e por me dar a oportunidade de fazer minha pós-graduação no Programa de Pós-graduação em Urologia da UNIFESP.

Ao **Prof. Dr. Ricardo Pimenta Bertolla**, pela coorientação, ajuda e paciência na realização de todas as fases do meu mestrado. Além de mostrar a real definição de ser um aluno de pós-graduação, estando sempre presente em todos os aprendizados necessários para o desenvolvimento de um raciocínio científico.

Ao **Dr. Daniel Suslik Zylbersztejn** pela participação no recrutamento e avaliação de todos os adolescentes incluídos nesse estudo.

Ao **Dr. Edson Guimarães Lo Turco, Dr. Renato Fraietta e à Dra. Deborah Montagnini Spaine** pelo incentivo e contribuição durante a realização desse trabalho.

Aos profissionais do Laboratório de Andrologia da UNIFESP, **Danielle Spínola Tibaldi, Dra. Valéria Barradas, Carolina Homs, Silene Fernandes da Costa, Sérgio Antonio Batista Correa e Raimundo Gonçalves Moreira**, por sempre terem colaborado na análise seminal de todas as amostras.

A **Dra. Paula Toni del Giudice** por desenvolver o trabalho inicial que deu origem a essa dissertação de mestrado e, pela colaboração durante o desenvolvimento do trabalho.

Às pós-graduandas **Rhayza Roberta Andretta e Mariana Camargo** por me ajudarem em todo o meu mestrado, e no entendimento do *Western blotting*, pois sem este eu não teria conseguido padronizar essa técnica, e por toda paciência e amizade.

Às pós-graduandas **Mariana Antoniassi, Paula Intasqui Lopes e Maria Beatriz Ribeiro de Andrade** que me acompanharam desde o início do meu mestrado e me ajudaram em tudo que precisei, sempre com muita sinceridade, paciência e amizade.

A todos os Pós-Graduandos do Centro de Pesquisa em Urologia da UNIFESP, **Augusto Azzolini de Melo, Beatriz Zappellini, Bruna Tuani de Lima, Daniela**

Antunes Montani, Fatima Kazue Okada, Fernanda Bertuccez Cordeiro, Jacqueline Camillo, Jessica Timóteo Jeremias, Jheysson Alfredo Cordeiro de Moura, Lívia do Vale T. da Costa, Larissa Berioni, Luana Nayara Gallego Adami, Raquel Cellin Rochetti, Renata Carvalho, que de alguma maneira, colaboraram para a realização deste trabalho.

Aos meus amigos que a graduação fizeram com que se tornassem meus irmãos: **Carolina Lopes Pereira, Daniel Rocha, Fernanda Creres Rosa, Gabriela Nóbrega Lavorini, Lucas Giglio Colli, Rafael Cabbia e Vinícius Augusto Simão,** por toda a amizade e por sempre me apoiarem.

Às minhas amigas **Letícia Bona Travagin e Marcela Taborda Stolf** por toda a sinceridade e amizade em todos os momentos da minha vida.

Ao meu noivo **Leonardo Di Schiavi Trotta** por acima de tudo ser meu melhor amigo e me incentivar em todas as minhas decisões e momentos da minha vida.

Ao meu irmão **Gabriel Berloff Belardin** por sempre estar comigo e ser o meu grande sonho que se realizou.

A toda a minha família, em especial aos meus pais, **Tereza Fruchi Berloff Belardin e Daniel Belardin,** que sempre estiveram do meu lado em todas as minhas decisões, e aos meus avós, **Maria Ap. Bahú Belardin e Leonel Bertão Belardin,** por todo incentivo e por sempre acreditarem em mim.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio financeiro em forma de bolsa de Mestrado (processo nº: 2014/11636-6), sem a qual não seria possível a realização desse estudo.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo auxílio pesquisa (Chamada Universal 2014, processo nº: 454514/2014-0), sem o qual não seria possível realizar esta pesquisa.

“A verdadeira viagem de descobrimento não consiste em procurar novas paisagens,
mas em ter novos olhos”.

Marcel Proust

Sumário

Dedicatória.....	iv
Agradecimentos.....	v
Lista de figuras.....	x
Lista de quadros e tabelas.....	xii
Lista de abreviaturas e símbolos.....	xiii
Resumo.....	xiv
Abstract.....	xv
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 OBJETIVOS.....	4
3 MATERIAL E MÉTODO.....	5
3.1 Pacientes.....	5
3.2 Análise seminal e divisão dos grupos de estudo.....	6
3.3 Validação dos biomarcadores.....	7
3.3.1 Ensaio de quantificação de proteínas.....	8
3.3.2 <i>Western blotting</i>	8
3.4. Análise estatística dos resultados.....	10
4 RESULTADOS.....	11
4.1 Exame físico e espermograma.....	11
4.2 <i>Western blotting</i>	14
5 DISCUSSÃO.....	21
6 CONCLUSÃO.....	25
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	26
8 ANEXOS	

Lista de Figuras

Figura 1. Organograma funcional dos experimentos realizados.....	7
Figura 2. Exemplos de imagens de Western blotting para as proteínas Cab45, LEFTY1, DNase I, PAP2- <i>Alpha</i> , IGFBP7, IGHG3, CRISP3, DJ-1 (proteína constitutiva testicular), indicando volume das bandas para os grupos: Controle (C), varicocele e sêmen normal (VSN) e varicocele e sêmen alterado (VSA).....	15
Figura 3. Gráfico de barras representando o nível seminal da proteína Cab45 dos grupos: Controle (C), varicocele e sêmen normal (VSN) e varicocele e sêmen alterado (VSA).....	17
Figura 4. Gráfico de barras representando o nível seminal da proteína LEFTY1 dos grupos: Controle (C), varicocele e sêmen normal (VSN) e varicocele e sêmen alterado (VSA).....	17
Figura 5. Gráfico de barras representando o nível seminal da proteína DNase I dos grupos: Controle (C), varicocele e sêmen normal (VSN) e varicocele e sêmen alterado (VSA).....	18
Figura 6. Gráfico de barras representando o nível seminal da proteína PAP2 - <i>Alpha</i> dos grupos: Controle (C), varicocele e sêmen normal (VSN) e varicocele e sêmen alterado (VSA).....	18

Figura 7. Gráfico de barras representando o nível seminal da proteína IGFBP7 dos grupos: Controle (C), varicocele e sêmen normal (VSN) e varicocele e sêmen alterado (VSA)..... 19

Figura 8. Gráfico de barras representando o nível seminal da proteína IGHG3 dos grupos: Controle (C), varicocele e sêmen normal (VSN) e varicocele e sêmen alterado (VSA)..... 19

Figura 9. Gráfico de barras representando o nível seminal das duas isoformas da proteína CRISP-3 dos grupos: Controle (C), varicocele e sêmen normal (VSN) e varicocele e sêmen alterado (VSA)..... 20

Lista de Quadros e Tabelas

Quadro 1. Potenciais proteínas biomarcadoras de disfunção testicular em adolescentes com varicocele.....	3
Quadro 2. Anticorpos utilizados para a validação dos biomarcadores propostos.....	10
Tabela 1. Dados clínicos de varicocele nos grupos controle (C), com varicocele e sêmen normal (VSN) e com varicocele e sêmen alterado (VSA)..	11
Tabela 2. Análise seminal e dados clínicos de adolescentes pertencentes ao grupo controle (C), em adolescentes com varicocele e sêmen normal (VSN) e em adolescentes com varicocele e sêmen alterado (VSA). Os grupos foram comparados pelo teste paramétrico ANOVA com o teste <i>post hoc</i> Sidak, a não ser quando especificado.....	13
Tabela 3. Níveis seminais de Cab45, LEFTY1, DNase I, PAP2- <i>Alpha</i> , IGFBP7, IGHG3 e CRISP-3. Os grupos foram comparados pelo teste paramétrico ANOVA com o teste <i>post hoc</i> Sidak.....	15

Lista de Abreviaturas e Símbolos

ANOVA	Análise de variância
BCA	Ácido bicinconínico
BSA	Albumina sérica bovina
C	Grupo controle
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
DP	Desvio padrão
ECL	<i>Enhanced chemiluminescence</i>
FAPESP	Fundação de Amparo à pesquisa do Estado de São Paulo
IC 95 %	Intervalo de confiança de 95% da média
IR	Intervalo interquartil
LC-MS/MS	Cromatografia líquida seguida de espectrometria de massas em tandem (do inglês <i>liquid chromatography - tandem mass spectrometry</i>)
PLS	Regressão por mínimos quadrados parciais (do inglês <i>Partial Least Squares</i>)
p:v	Relação peso:volume
Q1-Q3	Primeiro e o terceiro quartil, respectivamente
SDS	Docecil sulfato de sódio (do inglês <i>Sodium dodecyl sulfate</i>)
SDS PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (do inglês <i>Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>)
SENAI	Serviço Nacional de Aprendizagem Industrial
UNIFESP	Universidade Federal de São Paulo
TTBS	Tampão salina Tris com <i>Tween 20</i>
u.a.	Unidades arbitrárias
VIP	Importância da variável à projeção (do inglês <i>variable importance to the projection</i>)
VSA	Grupo varicocele e sêmen alterado
VSN	Grupo varicocele e sêmen normal
v:v	Relação volume:volume
xG	Força centrífuga rotacional, em gravidades

Resumo

Objetivo: Verificar o nível de expressão de proteínas com potencial biomarcador para alteração testicular na varicocele em adolescentes. Os objetivos específicos foram verificar se a presença de varicocele e de alteração seminal trazem alterações nos níveis das seguintes proteínas: Cab45 (45 kDa *calcium-binding protein*); LEFTY1 (*Left-right determination factor 1*); DNase I (*Deoxyribonuclease-1*); PAP2-Alpha (*Lipid phosphate phosphohydrolase 1*); IFGBP7 (*Insulin-like growth factor-binding protein 7*); IGHG3 (*Ig gamma-3 chain C region*); CRISP-3 (*Cysteine-rich secretory protein 3*). **Método:** Este estudo observacional foi constituído por 61 adolescentes, com idade entre 15 e 17 anos e, maturidade sexual completa (Tanner V), que foram divididos em 3 grupos: Controle (sem varicocele, n=20); VSN (com varicocele e sêmen normal, n=22); e VSA (com varicocele e sêmen alterado, n=19). Os adolescentes coletaram 1 amostra seminal com 2 a 5 dias de abstinência ejaculatória. Após a liquefação, as amostras foram submetidas à centrifugação para que o plasma seminal fosse separado dos demais constituintes celulares e, então, após a quantificação total de proteínas, um volume correspondente a 50 µg de proteína por adolescente foi utilizado para a quantificação das seguintes proteínas Cab 45, LEFTY1, DNase I, PAP2-Alpha, IGFBP7, IGHG3 e CRISP-3 (todas foram normalizadas para a proteína *Epididymis Secretory Sperm Binding Protein Li 67p* [DJ-1]), pelo método de *Western blotting*. **Resultados:** Os indivíduos pertencentes ao grupo VSA apresentaram menor média de concentração de espermatozoides (milhões/mL) e células morfolologicamente normais (% normais) com relação aos demais grupos experimentais. Observou-se diminuição nos níveis da proteína Cab45 em ambos os grupos de adolescentes com varicocele (VSN e VSA), sendo que o grupo VSA apresentou menor média. Os níveis da proteína DNase I estavam menores no grupo de adolescentes com varicocele e sêmen alterado (VSA). Observou-se uma hiperexpressão da proteína IGFBP7 nos grupos com varicocele quando comparados ao grupo controle e, uma hiperexpressão das duas isoformas da proteína CRISP-3 no grupo VSA. **Conclusão:** A proteômica do plasma seminal reflete alterações nas funções testiculares na varicocele em adolescentes. Os níveis das proteínas LEFTY1, PAP2-Alpha, IGHG3 não estão alterados com a presença de varicocele. Os níveis de Cab45 estão diminuídos na presença de varicocele; os níveis de DNase I estão diminuídos na presença de alterações seminais e varicocele. Por um lado, a proteína IFGBP7 é um marcador positivo para varicocele, e a CRISP-3 é um marcador positivo para varicoccele e qualidade seminal alterada. Esses resultados podem futuramente ajudar na determinação da conduta médica para uma intervenção cirúrgica precoce na varicocele.

Palavras-chave: adolescente; proteínas de plasma seminal; proteômica; testículo; varicocele.

Abstract

Objective: To verify the seminal levels of potential biomarkers for testicular changes in adolescent varicocele. The specific objectives were to verify if the presence of varicocele and seminal alterations can alter the levels of the following proteins: Cab45 (45 kDa calcium-binding protein); LEFTY1 (Left-right determination factor 1); DNase I (deoxyribonuclease-1); PAP2-*Alpha* (Lipid phosphate phosphohydrolase 1); IGFBP7 (Insulin-like growth factor binding protein-7); IGHG3 (Ig gamma-3 chain C region); CRISP-3 (Cysteine-rich secretory protein 3). **Method:** This observational study included 61 adolescents, aged 15 to 17 years old with full sexual maturity (Tanner V), which were divided into 3 groups: control (without varicocele, n=20); VSN (with varicocele, normal semen analysis, n=22); and VSA (with varicocele and altered semen analysis, n=19). The adolescents collected one seminal sample after 2 to 5 days of ejaculatory abstinence. After semen liquefaction semen was centrifuged, in order to separate the seminal plasma from cellular constituents. Total protein in each sample was then quantified, and a volume correspondent to 50 µg of protein for each patient was used for Western blotting for the follow proteins: Cab 45, LEFTY1, DNase I, PAP2-*Alpha*, IGFBP7, IGHG3 and CRISP-3 (all were normalized to the protein Epididymis Secretory Sperm Binding protein 67p Li [DJ-1]). **Results:** We observed lower sperm concentration (million/mL) and morphology (% normal sperm) in the VSA group when compared to the other groups. There was a decrease in the levels of Cab45 in both groups of adolescents with varicocele (VSN and VSA), with a lowest value in the VSA group. DNase I levels were lower in the group of adolescents with varicocele and altered semen analysis (VSA). There was an overexpression of IGFBP7 in the groups with varicocele when compared with control groups, and an overexpression of the two isoforms of CRISP-3 protein in the VSA group. **Conclusion:** Proteomics of seminal plasma reflects changes in testicular function in the adolescent varicocele. The levels of proteins LEFTY1, PAP2-*Alpha*, IGHG3 are not altered in the presence of a varicocele. Cab45 levels are decreased in the presence of varicocele; DNase I levels are decreased in the presence of seminal alterations and varicocele. Conversely, IGFBP7 is a positive marker of varicocele, and CRISP-3 is a positive marker of varicocele and altered semen quality. These results may help in the future to determine the medical management for early surgical intervention in varicocele.

Keywords: adolescent; seminal plasma proteins; proteomics; testis; varicocele.

Belardin, Larissa Berloff.

Validação de um painel de biomarcadores proteicos no plasma seminal de adolescentes com e sem varicocele / Larissa Berloff Belardin. – São Paulo, 2016.

xv, 31f.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de São Paulo. Escola Paulista de Medicina. Programa de Pós-graduação em Urologia.

Validation of a panel of protein biomarkers in seminal plasma of adolescents with and without varicocele.

1. Adolescente. 2. Proteínas de plasma seminal. 3. Proteômica. 4. Testículo. 5. Varicocele.

1 INTRODUÇÃO

A varicocele, principal causa tratável de infertilidade masculina (1,2), é definida como uma dilatação anormal das veias espermáticas internas do plexo pampiniforme com refluxo sanguíneo nas veias testiculares internas (3). Sua prevalência é de 15% tanto em adolescentes quanto na população adulta. Ademais, por afetar 35% de homens com infertilidade primária e mais de 80% com infertilidade secundária (4–6), sugere-se que a varicocele causa gradual disfunção testicular e declínio progressivo na fertilidade (7–9).

Em adolescentes com varicocele, o desenvolvimento testicular pode ser prejudicado, o que provoca efeitos deletérios na função testicular que podem levar à infertilidade (9) por comprometer a espermatogênese e resultar em alterações na concentração, motilidade e morfologia dos espermatozoides. O principal tratamento da varicocele é a varicocelectomia (10). Em adolescentes, a Associação Americana de Medicina Reprodutiva recomenda caso haja redução ipsilateral no volume testicular, qualidade seminal alterada, ou então ao primeiro sinal de disfunção testicular (14). Essa cirurgia está relacionada à melhora na qualidade seminal, tanto em adultos quanto em adolescentes com varicocele (12–14). Enquanto em adultos o objetivo do tratamento é reverter um quadro de infertilidade já estabelecido, em adolescentes, é o de preservar o potencial fértil (15).

Para o diagnóstico do potencial fértil de adultos e adolescentes, utiliza-se a análise seminal convencional; entretanto, essa possui baixa sensibilidade e especificidade (16). Nota-se que alguns adolescentes com varicocele e sem alteração na análise seminal podem apresentar aumento da fragmentação de DNA dos espermatozoides (17), demonstrando alterações nos parâmetros funcionais dos espermatozoides (17–19). Assim, as provas funcionais dos espermatozoides podem ser um recurso adicional ao investigar a varicocele em adolescentes (17,18,20), entretanto, ainda são insuficientes para determinar os danos testiculares que levam às alterações seminais observadas.

Mesmo com o avanço das provas funcionais, o diagnóstico das alterações causadas pela varicocele em adolescentes ainda se mostra prejudicado, uma vez que adolescentes não podem ser considerados inférteis, pois ainda não estão em busca pela paternidade (21). Além disso, nem todo adolescente com varicocele será um adulto infértil (22), mas poderá apresentar danos na espermatogênese (23). Por

consequente, existe controvérsia com relação a quais adolescentes devem ser tratados e quando essa intervenção cirúrgica deve ser realizada. Destarte, métodos moleculares para melhor diagnosticar a causa e progressão das alterações seminais causadas pela varicocele são importantes.

Dada esta característica gradativa de diminuição da função testicular e tendo em vista seu surgimento na adolescência, é importante detectar os efeitos da varicocele com a maior precocidade possível, uma vez que, 80% dos adolescentes diagnosticados com varicocele não apresentarão problemas de fertilidade na vida adulta (15,24). Ainda, de acordo com Smith *et al.* (4), nem todos os homens adultos que apresentam varicocele evidente são inférteis ou farão técnicas de reprodução assistida.

Os estudos moleculares do plasma seminal demonstraram enriquecer informações referentes às vias celulares e moleculares relacionadas às alterações seminais, devido à capacidade de identificar os mecanismos envolvidos na causa da infertilidade (25), como disfunções testiculares, que são observadas na varicocele. Além disso, estudos moleculares das propriedades e da forma na qual os espermatozoides são capazes de fertilizar o oócito podem identificar marcadores proteicos de fertilidade masculina a partir de dados proteômicos (26).

Dentre as moléculas encontradas no plasma seminal, destacam-se as proteínas intra e extracelulares (27), sendo que 10% dessas provém dos testículos e epidídimos (28). As proteínas do plasma seminal podem se ligar aos espermatozoides e atuar na sua sobrevivência (29), na regulação da motilidade (30–32) e da capacitação (29,33), na resposta imune no trato reprodutor feminino (34) e na fusão do espermatozoide com o oócito (35). Proteínas testiculares e epididimárias foram encontradas no plasma seminal de pacientes com e sem varicocele (23,27,36,37). Proteínas provenientes do epidídimo possuem relação com a qualidade do espermatozoide e consequente sucesso na fertilização (31).

Nesse sentido, nosso grupo de pesquisa realizou diversos estudos utilizando análise proteômica para observar a diferença na expressão de proteínas no plasma seminal de adolescentes com varicocele (20,23,38). Em um desses estudos (Anexo 1), hipotetizou-se que as proteínas do plasma seminal seriam diferencialmente expressas na varicocele (38). Para isso, o proteoma do plasma seminal foi comparado entre adolescentes controle (sem varicocele e com espermograma normal), com varicocele e espermograma normal (VSN) e com varicocele e

espermograma alterado (VSA). A partir de uma análise multivariada dos dados de identificação e quantificação proteicas, para comparação do perfil proteômico do plasma seminal entre os grupos experimentais, foi selecionado um painel de biomarcadores proteicos de disfunção testicular em adolescentes com varicocele. Biomarcadores são ferramentas e tecnologias que permitem o melhor entendimento das causas, progressão, diagnóstico, regressão ou na ajuda de um tratamento específico para uma doença (39). Para cada grupo de estudo, os seguintes possíveis biomarcadores foram selecionados:

Quadro 1. Potenciais proteínas biomarcadoras de disfunção testicular em adolescentes com varicocele.

Grupos	UniProt AC	Proteína
Controle (C)	Q9BRK5	<i>45 kDa calcium-binding protein (Cab45)</i>
	O75610	<i>Left-right determination factor 1 (LEFTY1)</i>
	P24855	<i>Deoxyribonuclease-1 (DNase I)</i>
	O14494	<i>Lipid phosphate phosphohydrolase 1 (PAP2-Alpha)</i>
(VSN)	Q16270	<i>Insulin-like growth factor-binding protein 7 (IGFBP7)</i>
	P01860	<i>Ig gamma-3 chain C region (IGHG3)</i>
(VSA)	P54108	<i>Cysteine-rich secretory protein 3 (CRISP-3)</i>

(VSN): Grupo de adolescentes com varicocele e espermograma normal.

(VSA): Grupo de adolescentes com varicocele e espermograma alterado

As proteínas que apresentam níveis de expressão alterados entre os grupos de estudo podem, portanto, ser consideradas potenciais biomarcadores. Para isso, estudos confirmatórios são necessários para que se determine de fato a relação da expressão do potencial biomarcador com a disfunção testicular associada à varicocele (40–42). Com isso, levando-se em consideração que proteínas testiculares encontradas no plasma seminal podem demonstrar associação com a função testicular em diferentes condições biológicas (43,44), hipotetiza-se que a confirmação desses potenciais biomarcadores poderá ajudar em um diagnóstico precoce e na preservação da fertilidade de adolescentes com varicocele.

2 OBJETIVOS

O objetivo deste estudo foi verificar o nível de expressão de proteínas com potencial biomarcador para alteração testicular na varicocele em adolescentes. Os objetivos específicos foram verificar se a presença de varicocele e de alteração seminal trazem alterações nos níveis das seguintes proteínas:

- Cab45 (*45 kDa calcium-binding protein*);
- LEFTY1 (*Left-right determination factor 1*);
- DNase I (*Deoxyribonuclease-1*);
- PAP2-Alpha (*Lipid phosphate phosphohydrolase 1*);
- IFGBP7 (*Insulin-like growth factor-binding protein 7*);
- IGHG3 (*Ig gamma-3 chain C region*);
- CRISP-3 (*Cysteine-rich secretory protein 3*).

3 MATERIAL E MÉTODO

Este estudo recebeu aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP (CAAE: 31701614.4.0000.5505) (Anexo 2), e foi financiado pela Fundação de Amparo à pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP - processo nº: 2014/11636-6) e pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq – Chamada Universal 2014, processo nº: 454514/2014-0). Todos os reagentes foram adquiridos da Sigma (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA), a não ser quando especificado.

3.1 Pacientes

Realizou-se um estudo observacional transversal a partir da inclusão de 61 adolescentes recrutados do Serviço Nacional de Educação Industrial (SENAI) em São Paulo – SP (Brasil). Para o recrutamento, todos os adolescentes e seus representantes legais foram informados das condições do estudo a partir da leitura do termo de assentimento e consentimento (Anexos 3 e 4, respectivamente), e os que concordaram foram destinados ao estudo.

Todos os adolescentes apresentaram faixa etária entre 15 e 17 anos e estágio de maturidade sexual Tanner V. O diagnóstico de varicocele foi realizado por um único urologista, em uma sala com iluminação adequada e temperatura controlada ($>23^{\circ}\text{C}$), por meio da observação e palpação escrotal de acordo com Dubin & Amelar (45) e assim classificada em: grau I (dilatação do cordão espermático palpável somente com a realização da manobra de Valsalva), grau II (dilatação do cordão espermático facilmente palpável, com acentuado enchimento venoso durante a manobra de Valsalva) ou grau III (dilatação volumosa do cordão espermático facilmente visibilizado e ectasia intensificada durante manobra de Valsalva). O volume testicular foi aferido com auxílio de um orquidômetro Prader.

Foram excluídos do estudo pacientes sem varicocele e com sêmen alterado, os que relataram doenças sistêmicas como câncer e endocrinopatias (e seus tratamentos), malformação congênita dos órgãos genitais, síndromes genéticas, história prévia de cirurgia inguino-escrotal, orquite ou epididimite, torção testicular, distopia testicular, ausência de masturbação, relato de febre noventa dias antes do espermograma, evidência de infecção urogenital, leucocitospermia, obesidade, alterações endócrinas e outras condições que podem afetar a fertilidade.

3.2 Análise seminal e divisão dos grupos de estudo

As amostras seminais foram obtidas dos pacientes no Ambulatório de Urologia/Reprodução Humana do Hospital São Paulo - UNIFESP. A coleta do material foi realizada por masturbação, após um período de dois a cinco dias de abstinência ejaculatória, em área anexa ao laboratório e em recipientes de polipropileno estéreis.

Após a liquefação da amostra, uma alíquota foi submetida ao espermograma convencional, de acordo com as recomendações da Organização Mundial da Saúde de 2010 (46). O restante do volume seminal foi centrifugado a 800 xG por 30 minutos para separar o plasma seminal dos demais conteúdos da amostra, como espermatozoides e leucócitos. O plasma seminal foi, então, congelado a -20 °C até o momento da quantificação das proteínas totais e da identificação dos biomarcadores.

Após a realização do exame físico e do espermograma, os adolescentes foram agrupados em três grupos experimentais:

- Controle (C) (n=20) – adolescentes com varicocele grau I ou sem varicocele uni ou bilateral e sem nenhuma alteração na análise seminal;
- Com varicocele e espermograma normal (VSN) (n=22) – adolescentes com varicocele graus II e/ou III uni ou bilateral e sem nenhuma alteração na análise seminal;
- Com varicocele e espermograma alterado (VSA) (n=19) – adolescentes com varicocele graus II e/ou III uni ou bilateral e com alguma alteração na análise seminal.

Nesse estudo, foram inclusos no grupo controle tanto adolescentes que não apresentavam varicocele, quanto aqueles que apresentavam varicocele grau I, pois observou-se previamente, em um estudo com um grande número de indivíduos, que não há diferença na qualidade seminal de adolescentes com varicocele grau I e sem varicocele (47). Além disso, na maioria dos estudos, indivíduos com grau I são inclusos no grupo controle por não serem considerados indivíduos com varicocele clínica.

3.3 Validação dos biomarcadores

O estudo seguiu o desenho experimental demonstrado pela Figura 1. No momento da quantificação proteica, o plasma seminal foi descongelado à temperatura ambiente e centrifugado novamente a 16.100 xG por 30 minutos a 4 °C, para remover o restante dos debris celulares. Após a centrifugação, foi realizado o ensaio do ácido bicinonínico (BCA) para quantificação total de proteínas em cada amostra (Item 3.3.1). Para a validação dos biomarcadores, foi utilizado o método de *Western blotting* (Item 3.3.2). Os anticorpos utilizados estão apresentados no Quadro 2.

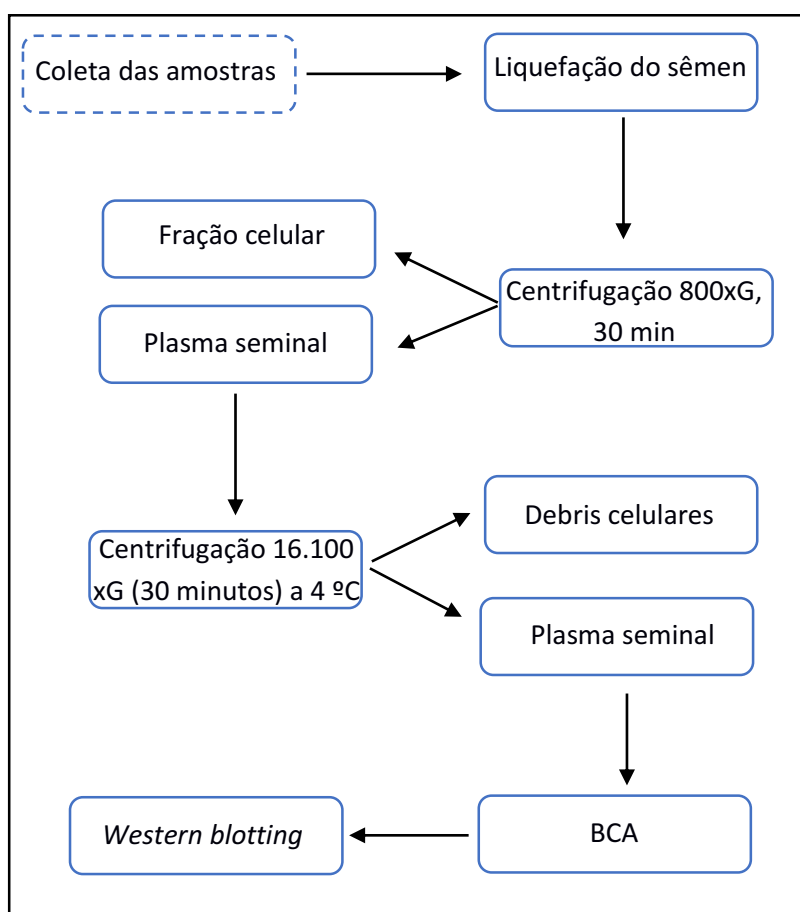


Figura 1. Organograma funcional dos experimentos realizados.

3.3.1 Ensaio de quantificação de proteínas

A concentração total de proteínas de cada amostra foi dosada por meio do ensaio de quantificação proteica BCA (ácido bicinconínico) modificado do método Lowry (48). Cada amostra foi quantificada em triplicata e a curva padrão (*protein standard*), em duplicata. Primeiramente, as amostras de plasma seminal foram diluídas em água na proporção de 1:80 (2,5 µL de amostra:197,5 µL de água), e a curva padrão foi diluída em água para que concentrações crescentes de proteína formassem a curva (de 0 a 1000 µg). Então, as amostras diluídas e a curva padrão foram adicionadas, em microplaca, a 200 µL da solução de BCA (solução A: *Bicinchoninic acid solution* e solução B: *Copper (II) sulfate solution*). A microplaca foi mantida a 37 °C por 30 minutos em banho-maria. A absorbância das amostras foi lida utilizando um leitor de microplacas (ELx800 *Absorbance Microplate Reader*, Biotek, Vermont, EUA) a 540 nm, pois as mesmas emitem um comprimento de onda de 562 nm.

Na leitura, as amostras que apresentaram coeficiente de variação (CV) maior que 5% foram quantificadas novamente, para assegurar maior precisão na quantificação. Após a quantificação, foi realizado o método de *Western blotting* para a validação dos biomarcadores.

3.3.2 Western blotting

A partir dos dados obtidos no BCA, um volume correspondente a 50 µg de proteínas do plasma seminal de cada paciente foi homogeneizado com água para a obtenção de um volume final de 7,5 µL, que foi diluído no mesmo volume (v:v) de tampão de amostra (0,125 M Tris-HCl pH 6,8, 4% [p:v] SDS, 20% [v:v] glicerol, 5% [v:v] Beta-mercaptoetanol, 0,02% azul de bromofenol) (Anexo 5).

Em seguida, as amostras foram aquecidas a 100 °C por cinco minutos e adicionadas a um gel de *SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis* (PAGE), com concentração de poliacrilamida de 4% para o *stacking* gel e de 10%, para o *running* gel, com condições desnaturantes. Como marcador de peso molecular, foi utilizado o *Full range rainbow* (GE Healthcare, Amersham Place, UK).

A separação das proteínas foi realizada em sistema de eletroforese digital (mini VE, GE Healthcare), por meio de eletroforese a 50 V e 400 mA por trinta minutos e, após este tempo, a tensão foi alterada para 150 V e a corrente permaneceu livre

(400 mA), até que as amostras chegassem ao fim do gel (aproximadamente duas horas e quinze minutos).

Em seguida, as proteínas foram transferidas dos géis para membranas de nitrocelulose (GE *Healthcare*) em sistema úmido (mini VE *Blotter*, GE *Healthcare*) por uma hora e trinta minutos a 4 °C, utilizando-se a corrente de 200 mA e a tensão de 25 V. Então, as membranas foram lavadas com TTBS (Tampão salina Tris com *Tween* 20) por 5 minutos e bloqueadas com solução de bloqueio (3% albumina sérica bovina [BSA] em TTBS) por uma hora no *shaker* em temperatura ambiente ou *overnight* no *shaker* a 4 °C.

Em seguida, as membranas foram incubadas com os anticorpos primários (Quadro 2) diluídos (de acordo com a recomendação do fabricante) em solução de bloqueio por duas horas em temperatura ambiente no *shaker* ou *overnight* a 4 °C. Após a incubação, as membranas foram lavadas três vezes por dez minutos com TTBS no *shaker* e incubadas com o anticorpo secundário conjugado à enzima peroxidase (anti-IgG de coelho - A0545, de camundongo - A9917 ou de cabra - SAB3700259). As membranas foram submetidas a outras três lavagens por dez minutos com TTBS no *shaker*. A detecção foi realizada utilizando-se o reagente “*enhanced chemiluminescence*” (ECL, GE *Healthcare*). Os sinais quimioluminescentes foram detectados utilizando o sistema de detecção ImageQuant LAS 4000 (GE *Healthcare*).

Após a detecção, as membranas foram incubadas com *mild stripping buffer* (0,2 M glicina, 0,1 % [p:v] SDS, 1% (v:v) *Tween* 20, pH 2,2) e incubadas com anticorpo primário anti-*human* DJ-1 (*Epididymis Secretory Sperm Binding Protein* Li 67p), que foi utilizada como proteína constitutiva testicular (SAB2500750, Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA). As imagens foram processadas pelo *Software* ImageQuant TL 7.0 (GE *Healthcare*, Amersham Place, Reino Unido). O volume das bandas de cada proteína de cada amostra foi ajustado para o *background* e normalizado para a concentração da proteína constitutiva DJ-1.

Quadro 2. Anticorpos utilizados para a validação dos biomarcadores propostos.

Grupo	Anticorpos	Tipo de anticorpo	Produzido em	Código (Sigma-Aldrich)
(C)	Anti-Cab45	Policlonal	Cabra	SAB2501769
	Anti-LEFTY1	Monoclonal	Camundongo	SAB1404852
	Anti-DNase1	Policlonal	Camundongo	SAB1405721
	Anti-PAP2- <i>Alpha</i>	Policlonal	Camundongo	SAB1409923
(VSN)	Anti-IGFBP7	Policlonal	Cabra	SAB2501563
	Anti-IGHG3	Policlonal	Camundongo	SAB1400135
(VSA)	Anti-CRISP-3	Policlonal	Coelho	C9996

(C): Grupo de adolescentes controle.

(VSN): Grupo de adolescentes com varicocele e espermograma normal.

(VSA): Grupo de adolescentes com varicocele e espermograma alterado.

3.4 Análise estatística dos resultados

Para a realização da análise estatística, foi utilizado o software SPSS (PASW) 18.0. Para comparar a frequência de varicocele entre os grupos (VSN e VSA), o teste de Qui-quadrado de Pearson foi empregado. Para a determinação da normalidade na distribuição dos dados de espermograma e *Western blotting*, foi utilizado o teste de Kolmogorov-Smirnov. Para os grupos que apresentaram distribuição normal e homoscedasticidade dos dados, foi utilizada a análise de variância paramétrica ANOVA, complementada com o teste *post-hoc* de Sidak. Nos casos em que isso não ocorreu, foi utilizada a análise de variância não paramétrica de Kruskal-Wallis, complementada com o teste de Games Howell. Os resultados foram considerados significativos quando $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 Exame físico e espermograma

Os dados clínicos de varicocele dos grupos de estudo estão apresentados na Tabela 1. Com base na análise de Qui-quadrado, as frequências dos diferentes graus de varicocele não diferiram entre os grupos VSN e VSA (Qui-quadrado de Pearson, $p=0,493$).

Tabela 1. Dados clínicos de varicocele nos grupos controle (C), com varicocele e sêmen normal (VSN) e com varicocele e sêmen alterado (VSA).

Grau de varicocele	Controle (n=20)	VSN (n=22)	VSA (n=19)
Sem varicocele	12 (60%)	-	-
I unilateral à direita	1 (5%)	-	-
I unilateral à esquerda	2 (10%)	-	-
I bilateral	5 (25%)	-	-
I à esquerda e II à direita	-	2 (9,09%)	-
II unilateral à esquerda	-	3 (13,63%)	1 (5,26%)
II à esquerda e I à direita	-	6 (27,27%)	5 (26,31%)
II bilateral	-	6 (27,27%)	4 (21,05%)
III unilateral à esquerda	-	-	1 (5,26%)
III à esquerda e I à direita	-	1 (4,54%)	3 (15,78%)
III à esquerda e II à direita	-	4 (18,18%)	4 (21,05%)
III bilateral	-	-	1 (5,26%)

Os resultados obtidos na análise seminal estão apresentados na Tabela 2. Adolescentes com varicocele e análise seminal alterada (VSA) apresentaram menor média ($p < 0,00001$) de concentração de espermatozoides (milhões/mL) do que os demais grupos estudados. Os grupos C e VSN não apresentaram diferença entre si. Além disso, a morfologia (% normais) foi menor ($p < 0,00001$) em pacientes do grupo VSA do que nos demais. O volume testicular esquerdo foi menor ($p = 0,046$) no grupo VSA quando comparado ao grupo controle, entretanto, não diferiu significativamente do grupo VSN.

Tabela 2. Análise seminal e dados clínicos de adolescentes pertencentes ao grupo controle (C), em adolescentes com varicocele e sêmen normal (VSN) e em adolescentes com varicocele e sêmen alterado (VSA). Os grupos foram comparados pelo teste paramétrico ANOVA com o teste post hoc Sidak, a não ser quando especificado.

	C (n=20)	VSN (n=22)	VSA (n=19)	p
Idade (anos)				
Mediana; IR	16,5; 2,00	16,0; 2,00	16,0; 1,00	Ω 0,595
Q1 - Q3	15,0 - 17,0	15,0 - 17,0	16,0 - 17,0	
Dias de abstinência				
Mediana; IR	3,5; 1,40	4,0; 2,00	3,0; 2,00	Ω 0,289
Q1 - Q3	2,9 - 4,0	3,0 - 5,0	2,3 - 4,0	
Volume ejaculado (mL)				
Mediana; IR	2,7; 1,15	2,7; 1,00	2,7; 1,40	Ω 0,937
Q1 - Q3	2,1 - 3,1	2,2 - 3,1	1,9 - 3,3	
Concentração de espermatozoides (milhões/mL)				
Média; DP	80,5; 50,49 ^a	96,1 ; 60,94 ^a	13,4 ; 11,25 ^b	<0,00001*
IC (95%)	56,9 - 104,2	69,8 - 122,5	8,1 - 18,9	
Motilidade progressiva (%)				
Mediana; IR	64,5; 10,50	58,0; 10,00	56,0; 16,00	Ω 0,122
Q1 - Q3	59,3 - 66,8	54 - 63,5	51,5 - 66,0	
Motilidade total (%)				
Média; DP	65,5; 7,25 ^a	60,1; 12,18 ^a	60; 12,65 ^a	0,201
IC (95%)	62,1 - 68,9	54,9 - 65,4	53,9 - 66,1	
Morfologia (% normais)				
Mediana; IR	9,5; 3,80 ^a	9,0; 4,00 ^a	2,0; 4,00 ^b	Ω <0,00001*
Q1 - Q3	7,8 - 11,0	6,0 - 10,0	1,5 - 4,5	
Volume testicular esquerdo (mL)				
Mediana; IR	20,0; 4,50 ^a	17,0; 3,00 ^{ab}	15,0; 6,00 ^b	Ω 0,046*
Q1 - Q3	15,5 - 20,0	15,0 - 18,0	12,0 - 18,0	
Volume testicular direito (mL)				
Mediana; IR	20,0; 4,25	18,0; 3,00	15,0; 3,00	Ω 0,186
Q1 - Q3	17,2 - 21,5	17,0 - 20,0	15,0 - 18,0	

DP – Desvio padrão.

IC (95%) – Intervalo de confiança de 95% da média.

Ω - Foi utilizado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, *post hoc* de Games Howell. Valores expressos em mediana; amplitude interquartil (IR).

IR – Intervalo interquartil.

Q1-Q3 – Representam o primeiro e o terceiro quartil, respectivamente.

Diferentes letras sobrescritas na mesma linha indica diferença significativa entre os grupos no teste *post hoc* (p<0,05).

4.2 Western blotting

Os resultados referentes à análise proteômica confirmatória por *Western blotting* estão representados na Tabela 3. Exemplos de figuras obtidas pelo ImageQuant LAS 4000 de cada proteína, com suas massas aproximadas, estão demonstrados na Figura 2. Os gráficos representando os níveis seminais de cada proteína estão apresentados nas Figuras 3 – 9.

A proteína Cab45 apresentou-se hipoexpressa em ambos os grupos de pacientes com varicocele (VSN e VSA) quando comparada ao grupo controle (C). Além disso quando compara-se os grupos de adolescentes com varicocele, observa-se diminuição gradual nos níveis dessa proteína, uma vez que houve hipoexpressão do grupo VSA quando comparado ao VSN. Observou-se uma hipoexpressão da proteína DNase I no grupo VSA com relação aos demais grupos (C e VSN) e, hiperexpressão da proteína IGFBP7 nos grupos com varicocele (VSN e VSA) quando comparada ao grupo controle (C). As duas isoformas da proteína CRISP-3 estavam hiperexpressas no grupo VSA quando comparadas aos demais. Os níveis das demais proteínas incluídas nesse estudo (LEFTY1, PAP2-*Alpha* e IGHG3) não apresentaram diferença entre os grupos.

Tabela 3. Níveis seminais de Cab45, LEFTY1, DNase I, PAP2-Alpha, IGFBP7, IGHG3 e CRISP-3. Dados apresentados em unidades arbitrárias (u.a). Os grupos foram comparados pelo teste paramétrico ANOVA com o teste *post hoc* Sidak.

	C (n=20)	VSN (n=22)	VSA (n=19)	p
Cab45				
Média; DP	1,24; 1,9 ^a	0,34; 0,6 ^b	0,01; 0,01 ^c	<0,0001 *
IC (95%)	0,3 - 2,1	0,05 - 0,6	0,009 - 0,02	
LEFTY1				
Média; DP	4,30; 7,4	7,70; 20,0	1,60; 2,8	0,773
IC (95%)	0,01 - 8,6	0 - 20,0	0 - 3,2	
DNase I				
Média; DP	1,50; 1,2 ^a	1,28; 1,6 ^a	0,27; 0,3 ^b	0,006 *
IC (95%)	0,9 - 2,1	0,5 - 2,0	0,1 - 0,4	
PAP2-Alpha				
Média; DP	1,06; 1,3	0,70; 0,6	0,72; 0,8	0,358
IC (95%)	0,5 - 1,6	0,4 - 0,9	0,3 - 1,1	
IGFBP7				
Média; DP	0,21; 0,02 ^a	1,00; 1,6 ^b	0,72; 1,1 ^b	<0,0001 *
IC (95%)	0,01 - 0,03	0,3 - 1,7	0,2 - 1,2	
IGHG3				
Média; DP	1,20; 0,8	1,60; 3,0	1,32; 1,3	0,921
IC (95%)	0,8 - 1,6	0,2 - 3,0	0,7 - 2,0	
CRISP3 29KDa				
Média; DP	1,80; 2,0 ^a	1,30; 1,7 ^a	84,20; 94 ^b	<0,0001 *
IC (95%)	0,8 - 2,7	0,5 - 2,1	37,4 - 130,9	
CRISP3 31KDa				
Média; DP	1,74; 1,5 ^a	1,60; 2,5 ^a	113,62; 152,2 ^b	<0,0001 *
IC (95%)	1,0 - 2,5	0,4 - 2,7	38,0 - 189,3	

DP – Desvio padrão.

IC (95%) – Intervalo de confiança de 95% da média.

Diferentes letras sobrescritas na mesma linha indica diferença significativa entre os grupos no teste *post hoc* (p<0,05).

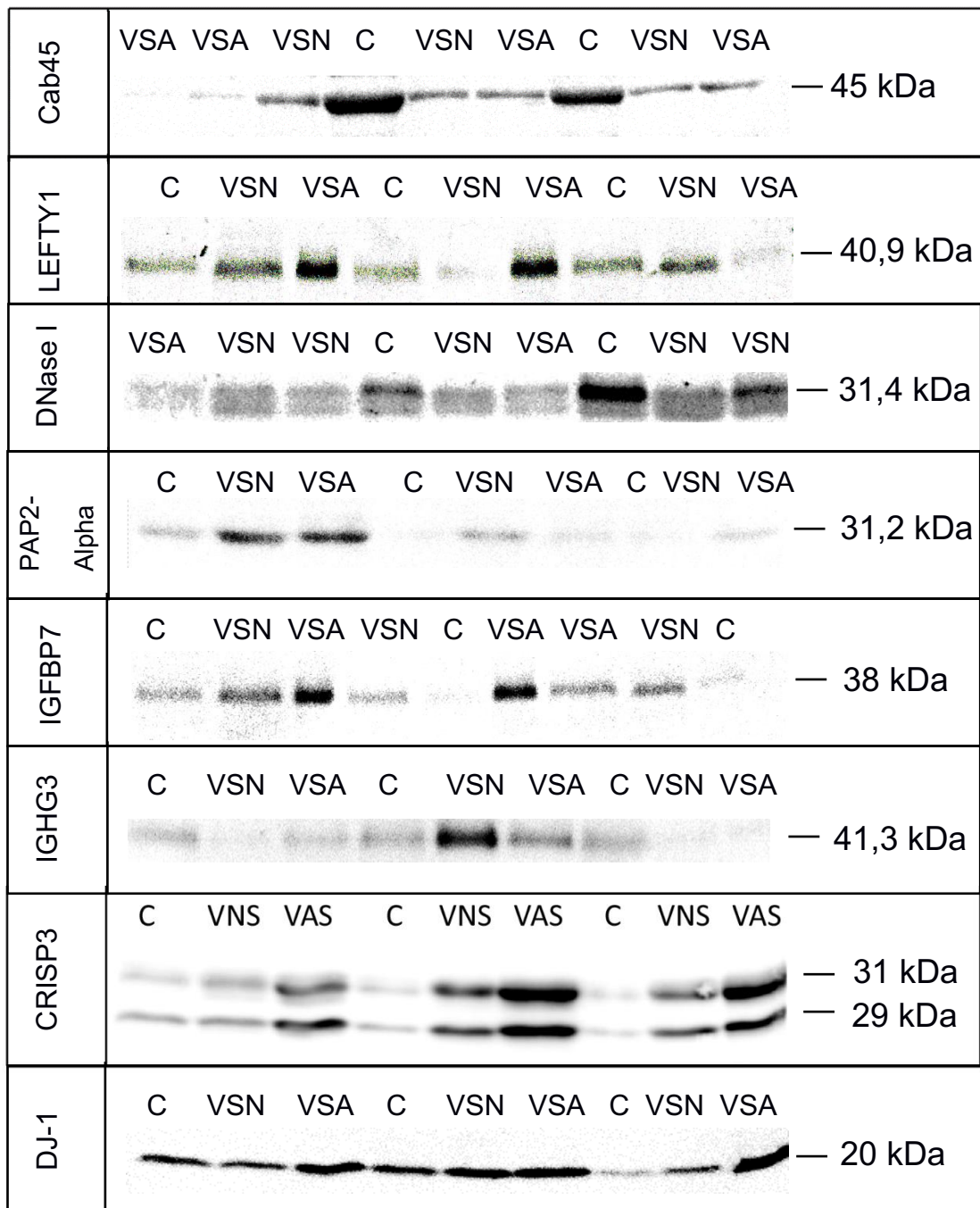


Figura 2. Exemplos de imagens de *Western blotting* para as proteínas Cab45, LEFTY1, DNase I, PAP2-*Alpha*, IGFBP7, IGHG3, CRISP3, DJ-1 (proteína constitutiva testicular), indicando volume das bandas para os grupos: Controle (C), varicocele e sêmen normal (VSN) e varicocele e sêmen alterado (VSA).

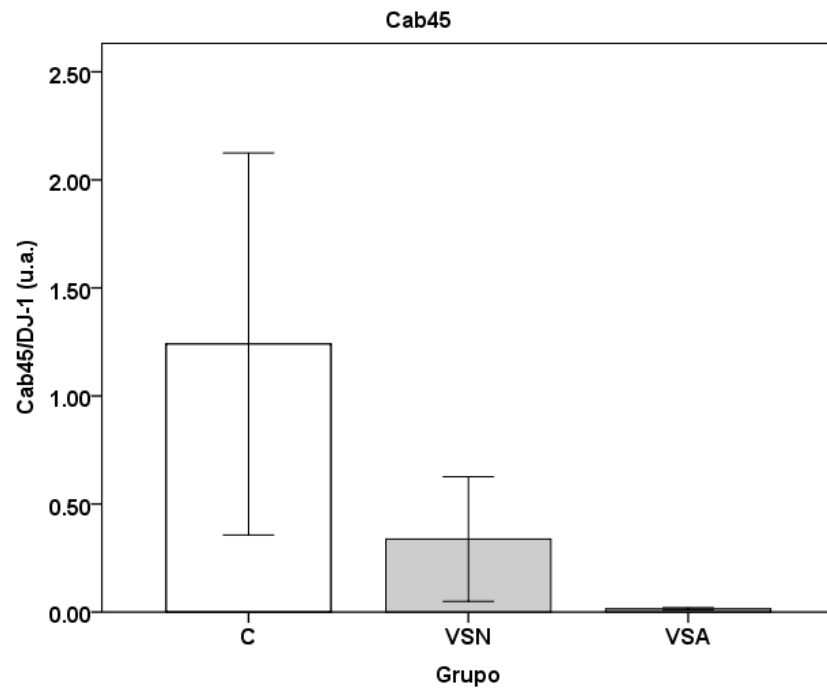


Figura 3. Gráfico de barras representando o nível seminal da proteína Cab45 dos grupos: Controle (C), varicocele e sêmen normal (VSN) e varicocele e sêmen alterado (VSA).

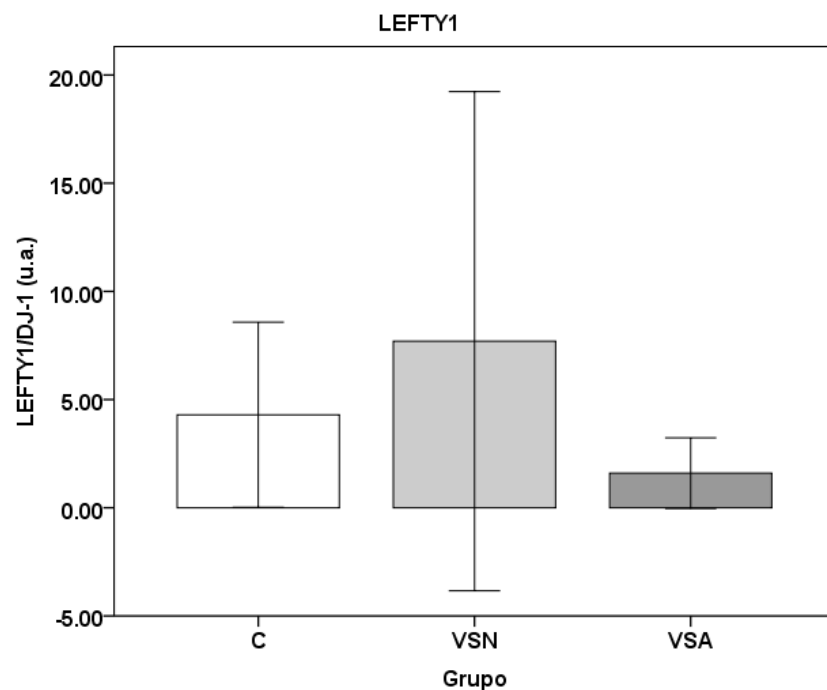


Figura 4. Gráfico de barras representando o nível seminal da proteína LEFTY1 dos grupos: Controle (C), varicocele e sêmen normal (VSN) e varicocele e sêmen alterado (VSA).

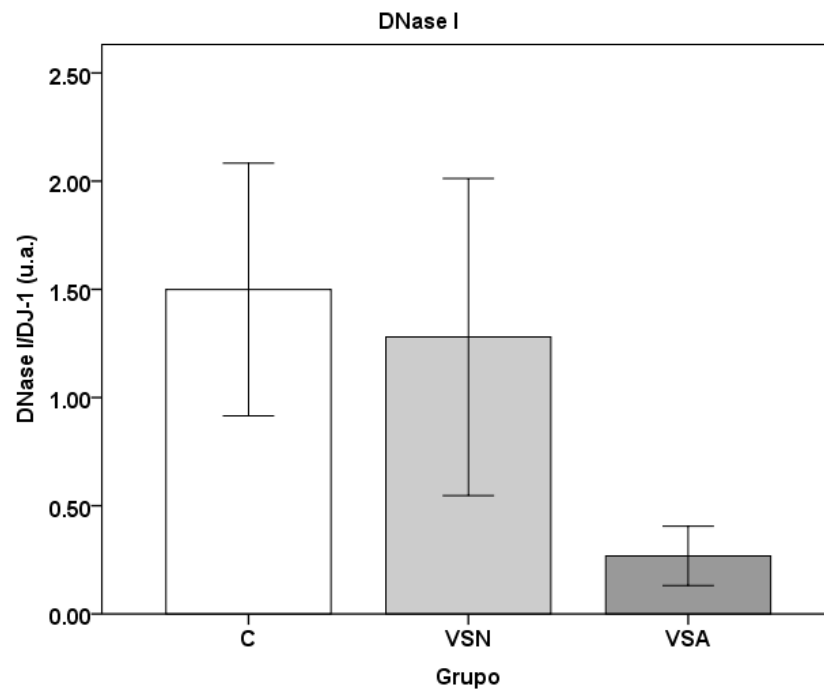


Figura 5. Gráfico de barras representando o nível seminal da proteína DNase I dos grupos: Controle (C), varicocele e sêmen normal (VSN) e varicocele e sêmen alterado (VSA).

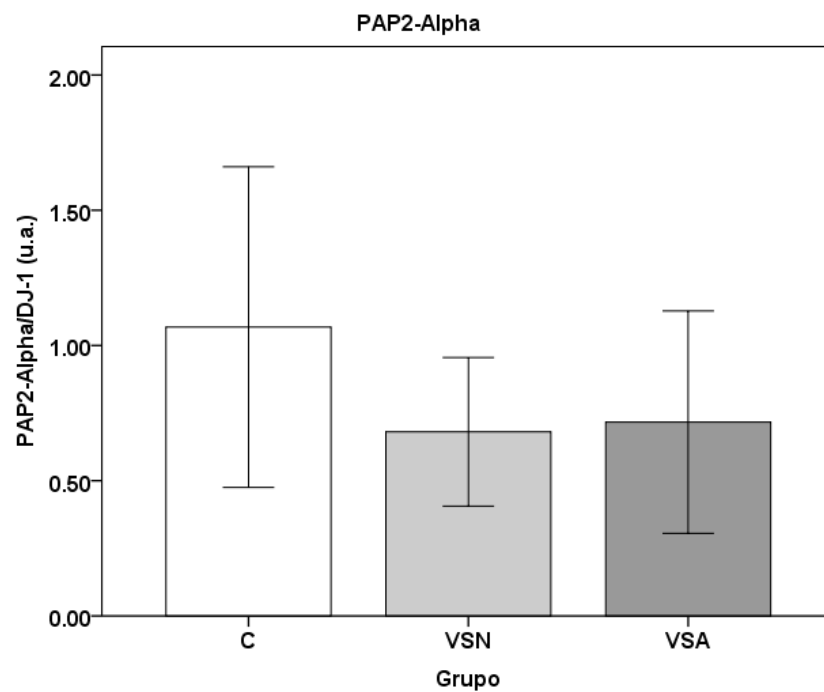


Figura 6. Gráfico de barras representando o nível seminal da proteína PAP2 - Alpha dos grupos: Controle (C), varicocele e sêmen normal (VSN) e varicocele e sêmen alterado (VSA).

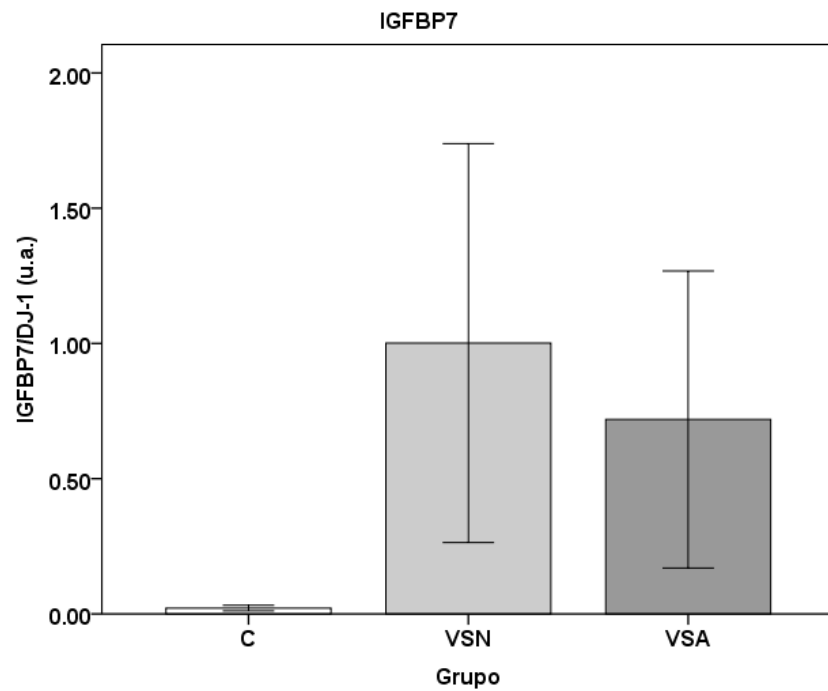


Figura 7. Gráfico de barras representando o nível seminal da proteína IGFBP7 dos grupos: Controle (C), varicocele e sêmen normal (VSN) e varicocele e sêmen alterado (VSA).

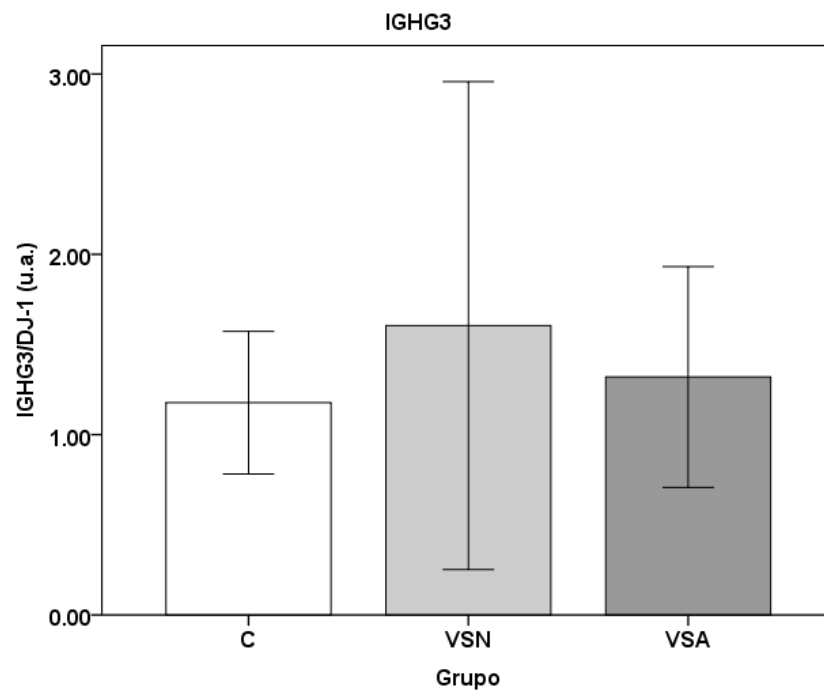


Figura 8. Gráfico de barras representando o nível seminal da proteína IGHG3 dos grupos: Controle (C), varicocele e sêmen normal (VSN) e varicocele e sêmen alterado (VSA).

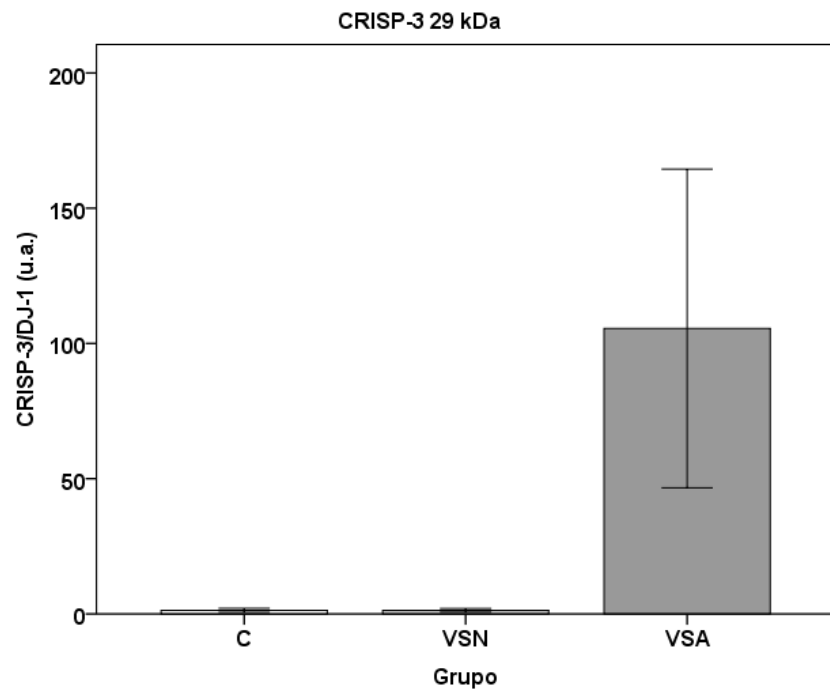


Figura 9. Gráfico de barras representando o nível seminal da isoforma de 29 kDa da proteína CRISP-3 dos grupos: Controle (C), varicocele e sêmen normal (VSN) e varicocele e sêmen alterado (VSA).

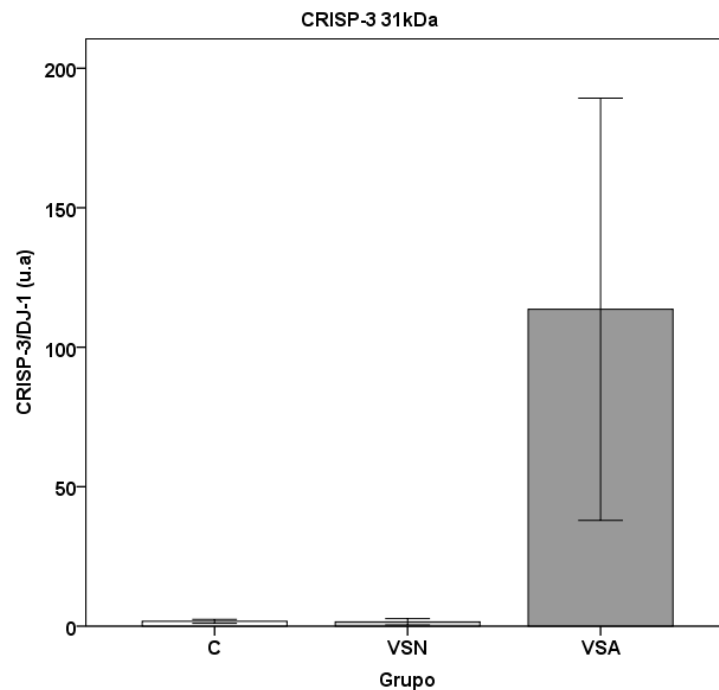


Figura 9. Gráfico de barras representando o nível seminal da isoforma de 29 kDa da proteína CRISP-3 dos grupos: Controle (C), varicocele e sêmen normal (VSN) e varicocele e sêmen alterado (VSA).

5 DISCUSSÃO

Quando particularizamos o estudo da varicocele em adolescentes, devemos levar em consideração que existem algumas diferenças importantes quando comparada à investigação da varicocele em adultos. Em primeiro lugar nem todos os adolescentes com varicocele apresentarão diminuição no potencial fértil na vida adulta (15,24), mas muitos destes ainda podem apresentar prejuízos na espermatogênese (23). Ademais, uma vez que a espermatogênese está sendo iniciada nesses indivíduos, e portanto as alterações observadas em uma amostra podem ser transitórias (49), a análise seminal convencional não é indicada para um laudo decisivo das alterações causadas pela varicocele (16), o que aumenta a complexidade da avaliação das variáveis seminais. Percebe-se assim que são necessários estudos que visam enriquecer informações a respeito das vias moleculares relacionadas com a varicocele e, assim determinar quais adolescentes devem ser tratados, uma vez que o potencial fértil destes pode ser prejudicado no futuro (17,47,49).

Apesar de estar bem demonstrado que em adolescentes a varicocele pode alterar a qualidade funcional do sêmen (18), mesmo na ausência de alteração no espermograma (17), ainda não são elucidados os mecanismos moleculares subjacentes a essas alterações. Nesse contexto, o estudo das proteínas do plasma seminal, além de demonstrar esses mecanismos, pode ainda resultar na indicação de biomarcadoras de disfunção testicular em adolescentes, o que por consequência pode impactar na conduta a ser tomada, se uma expectante ou de intervenção. Com isso, o objetivo deste estudo foi validar as potenciais proteínas biomarcadoras seminais relacionadas a disfunções testiculares em adolescentes com varicocele com e sem alteração seminal.

As proteínas do plasma seminal podem ter origem do fluido da luz dos túbulos seminíferos (43), do fluido epididimário, que contém proteínas secretadas e microvesículas específicas – epididimossomos – com função de transferir proteínas aos espermatozoides e ao plasma seminal (44) de proteínas advindas das vesículas seminais e da próstata (50,51). Estudos anteriores do nosso grupo de pesquisa demonstraram que as proteínas identificadas no plasma seminal de adolescentes sem varicocele (controle) estão relacionadas com a manutenção das funções

homeostáticas (23), ao passo que em adolescentes com varicocele após a varicocelectomia havia proteínas que estavam associadas a uma tentativa de retorno à homeostase (20). Proteínas que são responsáveis pela produção de filamentos também já foram observadas; estas podem representar a normalidade dos eventos da espermiogênese, o que pode ser corroborado por estudos que identificaram proteínas intracelulares e pertencentes ao citoesqueleto celular no plasma seminal (34,50).

Em um outro trabalho de nosso grupo de pesquisa (Anexo 1), foram identificadas diferenças no padrão de expressão de proteínas do plasma seminal de adolescentes controle (sem varicocele), com varicocele e análise seminal normal e com varicocele e análise seminal alterada. Nesse estudo foram sugeridas proteínas que poderiam ser biomarcadores de disfunção testicular em diferentes condições de varicocele em adolescentes (38). No presente estudo, buscamos validar os biomarcadores propostos nesse estudo anterior, utilizando a mesma divisão de adolescentes em grupos: adolescentes sem varicocele (C), com varicocele e sêmen normal (VSN) e com varicocele e sêmen alterado (VSA).

No grupo de adolescentes com varicocele e sêmen normal (VSN) a proteína Cab45 está hipoexpressa. Essa proteína é secretada no plasma seminal por meio de vesículas advindas dos epidídimos e próstata (epididimossomos e prostassomos, respectivamente) (52). A função dessa proteína está relacionada à regulação da exocitose dependente de íons de cálcio (53), podendo participar durante o processo de regulação de diversas funções cálcio-dependentes dos espermatozoides (54) que são importantes para a correta função dos espermatozoides. Dessa forma, sugere-se que funções dependentes de íons cálcio podem estar prejudicadas na varicocele, mesmo em adolescentes que não apresentam nenhuma alteração nos parâmetros do espermograma. Isso torna-se especialmente relevante quando consideramos que podem existir alterações funcionais nos espermatozoides em pacientes com varicocele mesmo na ausência de alterações no espermogramas (17,35,55). Dentre as funções cálcio-dependentes no sêmen, destacam-se os eventos de capacitação, hiperativação e reação acrossômica (56), que são eventos de suma importância para que ocorra a fusão do espermatozoide com o oócito e consequente fertilização, com isso as alterações nos mecanismos moleculares do sêmen podem levar à problemas de sucesso na gravidez na vida adulta.

A proteína IGFBP7 foi observada hiperexpressa no grupo VSN, essa proteína faz parte do grupo de proteínas de ligação a fatores de crescimento. Essas são relacionadas ao crescimento, diferenciação e proliferação celular em mamíferos (57). Essa proteína também é relacionada ao processo de adesão celular e estímulo para a produção de prostaciclina (PGI₂) (58,59), que é o principal produto da ciclo-oxigenase endotelial e por sua vez, é responsável por provocar vasodilatação (60). Sugere-se assim que os maiores níveis de expressão da proteína IGFBP7 nesse grupo (VSN) possam ocasionar alterações na diferenciação de células germinativas. Por outro lado, o eventual aumento nos níveis da PGI₂ pode estar relacionado a uma tentativa de diminuir o grau de hipóxia por aumentar o fluxo sanguíneo testicular, consequentemente diminuindo o estresse oxidativo.

No grupo de adolescentes com varicocele e sêmen alterado (VSA), observou-se diminuição da proteína Cab45, mesmo quando comparado ao grupo VSN, demonstrando que esse grupo também pode ter ainda mais alterações nas funções cálcio-dependentes nos espermatozoides, o que pode trazer prejuízos para a fertilidade do homem, por comprometer a qualidade dos espermatozoides. Nesse mesmo grupo de adolescentes (VSA), também foi observada uma diminuição nos níveis da proteína DNase I, que é uma endonuclease (61) responsável por digestão de resíduos de DNA, clivando-o preferencialmente em ligações fosfodiéster adjacentes a um nucleotídeo pirimídico, obtendo-se polinucleotídeos 5' - fosfato – que terminam com um grupo hidroxila livre na posição 3', produzindo tetranucleotídeos, que agem em fitas duplas e simples de DNA e na cromatina. A DNase I, e outros membros dessa família de proteínas, são dependentes de cálcio (Ca⁺²) e magnésio (Mg⁺²) (62). Além do seu papel como uma endonuclease de digestão, a DNase I é sugerida como uma das desoxirribonucleases responsáveis pela fragmentação de DNA durante a apoptose (63).

Ademais, a DNase I pode agir como uma nuclease autônoma em células que foram submetidas a apoptose induzida por drogas (64), demonstrando que esta proteína pode estar relacionada também à regulação da apoptose. Por esse motivo, provavelmente pela menor ação dessa proteína e pela alteração na regulação da apoptose, adolescentes com varicocele e sêmen alterado apresentam falha na regulação da apoptose das células germinativas, o que pode ser sugerido como um dos fatores responsáveis pela maior quantidade espermatozoides com DNA fragmentado no ejaculado de adolescentes com varicocele (17). Isso é importante

porque sugere uma origem testicular à alteração na qualidade do DNA dos espermatozoides nesses indivíduos, o que torna mais importante a abordagem cirúrgica. Algumas DNases também têm a função de promover a liberação dos espermatozoides ligados a neutrófilos após a inseminação (65). Em touros e cavalos, foi sugerido que peptídeos com domínios de DNase servem como marcadores de fertilidade (66). Assim, comprovado que essa proteína marca uma alteração testicular na varicocele, resta agora verificar se essa afirmação é verdade somente para variocoele, ou se também marca alteração testicular em outras afecções relacionadas à fertilidade do homem.

Assim como observado no grupo VSN, a proteína IGFBP7 também está com os níveis aumentados no grupo VSA, demonstrando que existe uma tentativa de diminuir o grau de hipóxia, por essa proteína estimular o eventual aumento na produção de PGI₂, o que pode ajudar na diminuição dos danos provocados pela varicocele. Entretanto, nesse grupo, a provável vasoditatação não foi capaz de reverter os danos causados pela varicocele (aumento de temperatura e hiopóxia) no ambiente testicular.

As duas isoformas da proteína CRISP-3 foram observadas de 64 a 71 vezes mais expressas no grupo de adolescentes com varicocele e sêmen alterado (VSA) quando comparado aos demais grupos experimentais. Essa proteína participa da resposta imune e de defesa (67,68), além de ter sido demonstrada sua associação com inflamação crônica em outros tecidos (67). Observa-se que o maior nível de expressão dessa proteína no grupo VSA representa processos inflamatórios no tecido testicular, o que pode ocasionar prejuízo na fertilidade, indicando que esse processo inflamatório testicular observado em adolescentes com varicocele e sêmen alterado pode ser um dos mecanismos pelos quais a varicocele traz prejuízos à fertilidade do homem. Por outro lado, a proteína IGHG3, que apresenta funções relacionadas ao sistema imune e complemento e participa da ligação a antígenos, não apresentou diferença entre os grupos experimentais (69). A presença de níveis similares em todos os grupos de estudo indica que existe uma alteração inflamatória, mas não imune, no ambiente testicular de adolescentes com varicocele (20,70,55). Monitorar esse ambiente inflamatório pode ser fundamental na determinação de um momento de intervenção nesses indivíduos.

Outras proteínas que foram analisadas neste estudo não apresentaram diferença entre os grupos. Dentre essas, a proteína LEFTY1, que é ativada por

domínios de fibronectina, é um fator de crescimento extracelular e está associada à migração celular (71,72). A proteína PAP2-*Alpha* tem grande expressão na próstata (73) e faz parte da via de sinalização de receptor de andrógenos. Além disso, assim como a LEFTY1, participa do processo de migração de células germinativas (74). Por seus níveis não diferirem entre os grupos do estudo, sugere-se que mesmo com alterações seminais, adolescentes com varicocele podem não apresentar alterações em eventos específicos de migração celular.

6 CONCLUSÃO

Com o presente estudo é possível concluir que:

- A proteômica do plasma seminal reflete alterações nas funções testiculares na varicocele em adolescentes;
- Os níveis de Cab45 estão diminuídos na presença de varicocele;
- Os níveis da proteína LEFTY1 não estão alterados com a presença da varicocele;
- Os níveis de DNase I estão diminuídos na presença de alterações seminais e varicocele;
- Os níveis da proteína PAP2-*Alpha* não estão alterados com a presença da varicocele;
- A proteína IFGBP7 é um marcador positivo para varicocele;
- Os níveis da proteína IGHG3 não estão alterados com a presença da varicocele;
- A CRISP-3 é um marcador positivo para variococoele e qualidade seminal alterada.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Benoff S, Gilbert BR. Varicocele and male infertility: part I. Preface. *Hum Reprod Update*. 2001 Feb;7(1):47–54.
2. Hauser R, Paz G, Botchan A, Yogev L, Yavetz H. Varicocele: effect on sperm functions. *Hum Reprod Update*. 2001 Oct;7(5):482–5.
3. Gat Y, Bachar GN, Zukerman Z, Belenky A, Gornish M. Varicocele: a bilateral disease. *Fertil Steril*. 2004 Feb;81(2):424–9.
4. Smith R, Kaune H, Parodi D, Madariaga M, Rios R, Morales I, et al. Increased sperm DNA damage in patients with varicocele: relationship with seminal oxidative stress. *Hum Reprod Oxf Engl*. 2006 Apr;21(4):986–93.
5. Witt MA, Lipshultz LI. Varicocele: a progressive or static lesion? *Urology*. 1993 Nov;42(5):541–3.
6. Gorelick JJ, Goldstein M. Loss of fertility in men with varicocele. *Fertil Steril*. 1993 Mar;59(3):613–6.
7. Saleh RA, Agarwal A, Sharma RK, Said TM, Sikka SC, Thomas AJ. Evaluation of nuclear DNA damage in spermatozoa from infertile men with varicocele. *Fertil Steril*. 2003 Dec;80(6):1431–6.
8. Zini A, Blumenfeld A, Libman J, Willis J. Beneficial effect of microsurgical varicocelectomy on human sperm DNA integrity. *Hum Reprod Oxf Engl*. 2005 Apr;20(4):1018–21.
9. Cozzolino DJ, Lipshultz LI. Varicocele as a progressive lesion: positive effect of varicocele repair. *Hum Reprod Update*. 2001 Feb;7(1):55–8.
10. Salem HK, Mostafa T. Preserved testicular artery at varicocele repair. *Andrologia*. 2009 Aug;41(4):241–5.
11. Cayan S, Shavakhov S, Kadioğlu A. Treatment of palpable varicocele in infertile men: a meta-analysis to define the best technique. *J Androl*. 2009 Feb;30(1):33–40.
12. Schlesinger MH, Wilets IF, Nagler HM. Treatment outcome after varicocelectomy. A critical analysis. *Urol Clin North Am*. 1994 Aug;21(3):517–29.
13. Madgar I, Weissenberg R, Lunenfeld B, Karasik A, Goldwasser B. Controlled trial of high spermatic vein ligation for varicocele in infertile men. *Fertil Steril*. 1995 Jan;63(1):120–4.
14. Nieschlag E, Hertle L, Fishedick A, Abshagen K, Behre HM. Update on treatment of varicocele: counselling as effective as occlusion of the vena spermatica. *Hum Reprod Oxf Engl*. 1998 Aug;13(8):2147–50.
15. Diamond D. Adolescent versus adult varicoceles--how do evaluation and management differ? *J Urol*. 2009 Jun;181(6):2418–9.
16. Milardi D, Grande G, Sacchini D, Astorri AL, Pompa G, Giampietro A, et al. Male fertility and reduction in semen parameters: a single tertiary-care center experience. *Int J Endocrinol*. 2012;2012:649149.
17. Bertolla RP, Cedenho AP, Hassun Filho PA, Lima SB, Ortiz V, Srougi M. Sperm nuclear DNA fragmentation in adolescents with varicocele. *Fertil Steril*. 2006 Mar;85(3):625–8.

18. Lacerda JI, Del Giudice PT, da Silva BF, Nichi M, Fariello RM, Fraietta R, et al. Adolescent varicocele: improved sperm function after varicocelectomy. *Fertil Steril*. 2011 Mar 1;95(3):994–9.
19. Blumer CG, Restelli AE, Giudice PTD, Soler TB, Fraietta R, Nichi M, et al. Effect of varicocele on sperm function and semen oxidative stress. *BJU Int*. 2012 Jan;109(2):259–65.
20. Del Giudice PT, da Silva BF, Lo Turco EG, Fraietta R, Spaine DM, Santos LFA, et al. Changes in the seminal plasma proteome of adolescents before and after varicocelectomy. *Fertil Steril*. 2013 Sep;100(3):667–72.
21. Marmar JL. What proteomic analysis of semen can tell us? *Fertil Steril*. 2013 Jan;99(1):64–5.
22. Benoff S, Marmar JL, Hurley IR. Molecular and other predictors for infertility in patients with varicoceles. *Front Biosci Landmark Ed*. 2009;14:3641–72.
23. Zylbersztejn DS, Andreoni C, Del Giudice PT, Spaine DM, Borsari L, Souza GHMF, et al. Proteomic analysis of seminal plasma in adolescents with and without varicocele. *Fertil Steril*. 2013 Jan;99(1):92–8.
24. The influence of varicocele on parameters of fertility in a large group of men presenting to infertility clinics. World Health Organization. *Fertil Steril*. 1992 Jun;57(6):1289–93.
25. Eskiocak S, Gozen AS, Yapar SB, Tavas F, Kilic AS, Eskiocak M. Glutathione and free sulphhydryl content of seminal plasma in healthy medical students during and after exam stress. *Hum Reprod Oxf Engl*. 2005 Sep;20(9):2595–600.
26. Milardi D, Grande G, Vincenzoni F, Messana I, Pontecorvi A, De Marinis L, et al. Proteomic approach in the identification of fertility pattern in seminal plasma of fertile men. *Fertil Steril*. 2012 Jan;97(1):67–73.e1.
27. Masson D, Drouineaud V, Moiroux P, Gautier T, Dautin G, Schneider M, et al. Human seminal plasma displays significant phospholipid transfer activity due to the presence of active phospholipid transfer protein. *Mol Hum Reprod*. 2003 Aug;9(8):457–64.
28. Drabovich AP, Jarvi K, Diamandis EP. Verification of male infertility biomarkers in seminal plasma by multiplex selected reaction monitoring assay. *Mol Cell Proteomics MCP*. 2011 Dec;10(12):M110.004127.
29. Zhao C, Huo R, Wang F-Q, Lin M, Zhou Z-M, Sha J-H. Identification of several proteins involved in regulation of sperm motility by proteomic analysis. *Fertil Steril*. 2007;87(2):436–8.
30. Miller DJ, Winer MA, Ax RL. Heparin-binding proteins from seminal plasma bind to bovine spermatozoa and modulate capacitation by heparin. *Biol Reprod*. 1990 Jun;42(5-6):899–915.
31. Ding Z, Qu F, Guo W, Ying X, Wu M, Zhang Y. Identification of sperm forward motility-related proteins in human seminal plasma. *Mol Reprod Dev*. 2007;74(9):1124–31.
32. Moldenhauer LM, Diener KR, Thring DM, Brown MP, Hayball JD, Robertson SA. Cross-presentation of male seminal fluid antigens elicits T cell activation to initiate the female immune response to pregnancy. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2009;182(12):8080–93.
33. Primakoff P, Myles DG. Penetration, adhesion, and fusion in mammalian sperm-egg interaction. *Science*. 2002;296(5576):2183–5.

34. Batruch I, Lecker I, Kagedan D, Smith CR, Mullen BJ, Grober E, et al. Proteomic analysis of seminal plasma from normal volunteers and post-vasectomy patients identifies over 2000 proteins and candidate biomarkers of the urogenital system. *J Proteome Res.* 2011 Mar 4;10(3):941–53.
35. Intasqui P, Camargo M, Del Giudice PT, Spaine DM, Carvalho VM, Cardozo KHM, et al. Unraveling the sperm proteome and post-genomic pathways associated with sperm nuclear DNA fragmentation. *J Assist Reprod Genet.* 2013 Sep;30(9):1187–202.
36. Wang J, Wang J, Zhang H-R, Shi H-J, Ma D, Zhao H-X, et al. Proteomic analysis of seminal plasma from asthenozoospermia patients reveals proteins that affect oxidative stress responses and semen quality. *Asian J Androl.* 2009;11(4):484–91.
37. Barbonetti A, Vassallo MRC, Di Rosa A, Leombruni Y, Felzani G, Gandini L, et al. Involvement of mitochondrial dysfunction in the adverse effect exerted by seminal plasma from men with spinal cord injury on sperm motility. *Andrology.* 2013 May;1(3):456–63.
38. Del Giudice PT, Belardin LB, Camargo M, Zylbersztejn DS, Carvalho VM, Cardozo KHM, et al. Determination of testicular function in the adolescent varicocele - a proteomics approach. *Aceito Para Publicação.*
39. Mayeux R. Biomarkers: potential uses and limitations. *NeuroRx J Am Soc Exp Neurother.* 2004 Apr;1(2):182–8.
40. An HJ, Lebrilla CB. A glycomics approach to the discovery of potential cancer biomarkers. *Methods Mol Biol Clifton NJ.* 2010;600:199–213.
41. Bateman NW, Sun M, Hood BL, Flint MS, Conrads TP. Defining central themes in breast cancer biology by differential proteomics: conserved regulation of cell spreading and focal adhesion kinase. *J Proteome Res.* 2010 Oct 1;9(10):5311–24.
42. Milardi D, Grande G, Vincenzoni F, Castagnola M, Marana R. Proteomics of human seminal plasma: identification of biomarker candidates for fertility and infertility and the evolution of technology. *Mol Reprod Dev.* 2013 May;80(5):350–7.
43. Gerena RL, Irikura D, Urade Y, Eguchi N, Chapman DA, Killian GJ. Identification of a fertility-associated protein in bull seminal plasma as lipocalin-type prostaglandin D synthase. *Biol Reprod.* 1998 Mar;58(3):826–33.
44. D'Amours O, Frenette G, Bordeleau L-J, Allard N, Leclerc P, Blondin P, et al. Epididymosomes transfer epididymal sperm binding protein 1 (ELSPBP1) to dead spermatozoa during epididymal transit in bovine. *Biol Reprod.* 2012 Oct;87(4):94.
45. Dubin L, Amelar RD. Varicocele size and results of varicocelectomy in selected subfertile men with varicocele. *Fertil Steril.* 1970 Aug;21(8):606–9.
46. World Health Organization. Laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction. Cambridge University Press; 2010.
47. Mori MM, Bertolla RP, Fraietta R, Ortiz V, Cedenho AP. Does varicocele grade determine extent of alteration to spermatogenesis in adolescents? *Fertil Steril.* 2008 Nov;90(5):1769–73.
48. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem.* 1985 Oct;150(1):76–85.

49. Mori MM, Cedenho AP, Koifman S, Srougi M. Sperm characteristics in a sample of healthy adolescents in São Paulo, Brazil. *Cad Saúde Pública*. 2002 Apr;18(2):525–30.
50. Pilch B, Mann M. Large-scale and high-confidence proteomic analysis of human seminal plasma. *Genome Biol*. 2006;7(5):R40.
51. Utleg AG, Yi EC, Xie T, Shannon P, White JT, Goodlett DR, et al. Proteomic analysis of human prostasomes. *The Prostate*. 2003 Jul 1;56(2):150–61.
52. Aalberts M, van Dissel-Emiliani FMF, van Adrichem NPH, van Wijnen M, Wauben MHM, Stout TAE, et al. Identification of distinct populations of prostasomes that differentially express prostate stem cell antigen, annexin A1, and GLIPR2 in humans. *Biol Reprod*. 2012 Mar;86(3):82.
53. Lam PPL, Hyvärinen K, Kauppi M, Cosen-Binker L, Laitinen S, Keränen S, et al. A cytosolic splice variant of Cab45 interacts with Munc18b and impacts on amylase secretion by pancreatic acini. *Mol Biol Cell*. 2007 Jul;18(7):2473–80.
54. Suarez SS. Control of hyperactivation in sperm. *Hum Reprod Update*. 2008 Dec;14(6):647–57.
55. Darszon A, Labarca P, Nishigaki T, Espinosa F. Ion channels in sperm physiology. *Physiol Rev*. 1999 Apr;79(2):481–510.
56. Pollak M. Insulin and insulin-like growth factor signalling in neoplasia. *Nat Rev Cancer*. 2008 Dec;8(12):915–28.
57. Akaogi K, Okabe Y, Funahashi K, Yoshitake Y, Nishikawa K, Yasumitsu H, et al. Cell adhesion activity of a 30-kDa major secreted protein from human bladder carcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 1994 Feb 15;198(3):1046–53.
58. Oh Y, Nagalla SR, Yamanaka Y, Kim HS, Wilson E, Rosenfeld RG. Synthesis and characterization of insulin-like growth factor-binding protein (IGFBP)-7. Recombinant human mac25 protein specifically binds IGF-I and -II. *J Biol Chem*. 1996 Nov 29;271(48):30322–5.
59. PTGIR Gene - GeneCards | PI2R Protein | PI2R Antibody [Internet]. [cited 2016 Mar 4]. Available from: <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=PTGIR&keywords=prostacyclin>
60. Laskowski M BP. The enzymes. In: 3rd ed. p. 289–311.
61. Liu QY, Ribecco M, Pandey S, Walker PR, Sikorska M. Apoptosis-related functional features of the DNaseI-like family of nucleases. *Ann N Y Acad Sci*. 1999;887:60–76.
62. Samejima K, Earnshaw WC. Trashing the genome: the role of nucleases during apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2005 Sep;6(9):677–88.
63. Oliveri M, Daga A, Cantoni C, Lunardi C, Millo R, Puccetti A. DNase I mediates internucleosomal DNA degradation in human cells undergoing drug-induced apoptosis. *Eur J Immunol*. 2001 Mar;31(3):743–51.
64. Alghamdi AS, Foster DN. Seminal DNase frees spermatozoa entangled in neutrophil extracellular traps. *Biol Reprod*. 2005 Dec;73(6):1174–81.

65. Alghamdi AS, Funnell BJ, Bird SL, Lamb GC, Rendahl AK, Taube PC, et al. Comparative studies on bull and stallion seminal DNase activity and interaction with semen extender and spermatozoa. *Anim Reprod Sci.* 2010 Sep;121(3-4):249–58.
66. Liao Q, Kleeff J, Xiao Y, Guweidhi A, Schambony A, Töpfer-Petersen E, et al. Preferential expression of cystein-rich secretory protein-3 (CRISP-3) in chronic pancreatitis. *Histol Histopathol.* 2003 Apr;18(2):425–33.
67. Udby L, Calafat J, Sørensen OE, Borregaard N, Kjeldsen L. Identification of human cysteine-rich secretory protein 3 (CRISP-3) as a matrix protein in a subset of peroxidase-negative granules of neutrophils and in the granules of eosinophils. *J Leukoc Biol.* 2002 Sep;72(3):462–9.
68. Ig gamma-3 chain C region -IGHG3 - Homo sapiens (Human) [Internet]. [cited 2014 May 13]. Available from: <http://www.uniprot.org/uniprot/P01860>
69. da Silva BF, Souza GHMF, lo Turco EG, Del Giudice PT, Soler TB, Spaine DM, et al. Differential seminal plasma proteome according to semen retrieval in men with spinal cord injury. *Fertil Steril.* 2013 Oct;100(4):959–69.
70. Intasqui P, Camargo M, Del Giudice PT, Spaine DM, Carvalho VM, Cardozo KHM, et al. Sperm nuclear DNA fragmentation rate is associated with differential protein expression and enriched functions in human seminal plasma. *BJU Int.* 2013 Oct;112(6):835–43.
71. Pulina MV, Hou S-Y, Mittal A, Julich D, Whittaker CA, Holley SA, et al. Essential roles of fibronectin in the development of the left-right embryonic body plan. *Dev Biol.* 2011 Jun 15;354(2):208–20.
72. Madhyastha H, Madhyastha R, Nakajima Y, Omura S, Maruyama M. Regulation of growth factors-associated cell migration by C-phycocyanin scaffold in dermal wound healing. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2012 Jan;39(1):13–9.
73. Ulrix W, Swinnen JV, Heyns W, Verhoeven G. Identification of the phosphatidic acid phosphatase type 2a isozyme as an androgen-regulated gene in the human prostatic adenocarcinoma cell line LNCaP. *J Biol Chem.* 1998 Feb 20;273(8):4660–5.
74. Kai M, Wada I, Imai S i, Sakane F, Kanoh H. Cloning and characterization of two human isozymes of Mg²⁺-independent phosphatidic acid phosphatase. *J Biol Chem.* 1997 Sep 26;272(39):24572–8.

10 ANEXOS

Anexo 1 – Estudo anterior do nosso grupo de pesquisa que observou diferenças no padrão de expressão de proteínas do plasma seminal de adolescentes controle (sem varicocele), com varicocele e análise seminal normal e com varicocele e análise seminal alterada.

ANDROLOGY



ISSN: 2047-2919

ANDROLOGY

ORIGINAL ARTICLE

Correspondence:

Paula Toni Del Giudice, MSc, PhD, Sao Paulo
Federal University, Rua Embau, 231, 04039-060,
Sao Paulo, SP, Brazil.

E-mail: paula.tdg@gmail.com
and

Ricardo Pimenta Bertolla, DVM, PhD, Sao Paulo
Federal University, Rua Embau, 231, 04039-060,
Sao Paulo, SP, Brazil.

E-mail: rbertolla@yahoo.com

Keywords:

adolescent, functional enrichment, proteomics,
seminal plasma, varicocele

Received: 11-Aug-2014

Revised: 3-Dec-2015

Accepted: 25-Jan-2016

Determination of testicular function in adolescents with varicocele – a proteomics approach

¹P. T. Del Giudice, ¹L. B. Belardin, ¹M. Camargo, ^{1,2}D. S. Zylbersztein, ³V. M. Carvalho, ³K. H. M. Cardozo, ^{1,2}R. P. Bertolla and ¹A. P. Cedenho

¹Division of Urology, Human Reproduction Section, Department of Surgery, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, Brazil, ²Hospital São Paulo, São Paulo, Brazil, and ³Fleury Group, São Paulo, Brazil

Anexo 2 – Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SÃO PAULO - UNIFESP/
HOSPITAL SÃO PAULO**



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Validação de um painel de biomarcadores proteicos no plasma seminal de adolescentes com e sem varicocele

Pesquisador: Larissa Berloff Belardin

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: 31701614.4.0000.5505

Instituição Proponente: Escola Paulista de Medicina

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 733.113

Data da Relatoria: 30/07/2014

Apresentação do Projeto:

Conforme parecer CEP. 719.751 de 16/4/2014

Objetivo da Pesquisa:

Conforme parecer CEP. 719.751 de 16/4/2014

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Conforme parecer CEP. 719.751 de 16/4/2014

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Conforme parecer CEP. 719.751 de 16/4/2014

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Trata-se de resposta de pendência apontada no parecer inicial

Recomendações:

não existem recomendações

Endereço: Rua Botucatu, 572 1º Andar Conj. 14

Bairro: VILA CLEMENTINO

CEP: 04.023-061

UF: SP

Município: SÃO PAULO

Telefone: (11)5539-7162

Fax: (11)5571-1062

E-mail: cepunifesp@unifesp.br

Continuação do Parecer: 733.113

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Pendências apontadas no parecer inicial:

Como participarão menores de idade , o pesquisador deverá elaborar um TERMO DE ASSENTIMENTO-TA, que deverá ser aplicado aos adolescentes. Reforçamos a orientação para que o assentimento seja elaborado de forma a permitir a compreensão da criança quanto à pesquisa. Salientamos que o termo de assentimento não dispensa o TCLE que deverá ser aplicado aos responsáveis legais.

Incluir no TCLE: Deve estar descrito que uma via deverá ficar com o pesquisador e outra com o participante. Todas as páginas do TCLE deverão estar numeradas (ex: 1/4, 2/4,) e devem ser rubricadas pelo pesquisador principal e participante no momento da aplicação do TCLE Trata-se de estudo de marcadores de plasma seminal em pacientes com varicocele e controles. Não há impedimento ético, exceto pelo fator de inclusão da idade ser já a partir de 10 anos, sem se mencionar como os pacientes serão recrutados quanto a este aspecto da coleta, se já iniciaram atividade masturbatória, se os pais consentem com este exame, em especial quando se consideram os controles, que estariam expostos numa idade precoce a uma coleta que envolve aspectos religiosos, morais e que precisam ser suficientemente considerados.

resposta: o pesquisador apresentou todas as respostas em carta anexada na plataforma .
O termo de assentimento foi adequadamente apresentado. PENDENCIAS ATENDIDAS.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

O CEP informa que a partir desta data de aprovação, é necessário o envio de relatórios parciais (anualmente), e o relatório final, quando do término do estudo.

Endereço: Rua Botucatu, 572 1º Andar Conj. 14

Bairro: VILA CLEMENTINO

CEP: 04.023-061

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)5539-7162

Fax: (11)5571-1062

E-mail: cepunifesp@unifesp.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SÃO PAULO - UNIFESP/
HOSPITAL SÃO PAULO



Continuação do Parecer: 733.113

SAO PAULO, 30 de Julho de 2014

Assinado por:

**Leonor do Espirito Santo de Almeida
Pinto (Coordenador)**

Endereço: Rua Botucatu, 572 1º Andar Conj. 14

Bairro: VILA CLEMENTINO

CEP: 04.023-061

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)5539-7162

Fax: (11)5571-1062

E-mail: cepunifesp@unifesp.br

Anexo 3 – Termo de assentimento.

Termo de Assentimento Informado para Adolescentes

Meu nome é Larissa Berloff Belardin e o meu trabalho é pesquisar varicocele em adolescentes. Varicocele é a dilatação das veias do testículo, que podem levar à infertilidade, ou seja: a dificuldade de ter filhos futuramente. Isto ocorre devido à redução na produção e qualidade dos espermatozoides produzidos pelos testículos. Queremos saber se existe, além da realização do exame físico, alguma proteína presente no sêmen de jovens que indique o momento correto de tratar a varicocele. Achamos que esta pesquisa possa nos ajudar a buscar esta resposta.

Eu vou informar você e convidá-lo a participar desta pesquisa. Você pode escolher se quer participar ou não. Discutimos esta pesquisa com seus pais ou responsáveis e eles sabem que também estamos pedindo seu acordo. Se você vai participar da pesquisa, seus pais ou responsáveis também terão que concordar. Mas se você não desejar fazer parte na pesquisa, não é obrigado, até mesmo se seus pais concordarem, se você discordar não haverá nenhum prejuízo no seu exame, tratamento e/ou outro procedimento a ser realizado.

Para que o estudo aconteça, você passará por uma consulta realizada por um urologista do Hospital São Paulo (UNIFESP) no próprio SENAI, onde responderá a um breve questionário e será submetido a exame físico para detecção de varicocele. Após, em data programada, você será encaminhado para realizar o exame de espermograma (colher sêmen para análise em laboratório) no Laboratório do Sêmen, na Rua Napoleão de Barros 628.

Após a realização destes exames você terá uma nova consulta com médicos para saber o resultado dos exames e da eventual necessidade de seguimento ou tratamento médico, a ser realizado na UNIFESP, pelo setor de Reprodução Humana.

Assinatura do paciente

Data ____/____/____

Anexo 4 – Termo de consentimento livre e esclarecido.

Termo de Consentimento livre e esclarecido

Título do Projeto: "Validação um painel de biomarcadores proteicos no plasma seminal de adolescentes com e sem varicocele".

Desenho do estudo e objetivo: O objetivo é o de confirmar a presença de proteínas que estão envolvidas em alterações sêmen, para com isso melhorar o modo de diagnóstico de doenças.

Informações Iniciais: Para que um indivíduo possa participar de uma pesquisa envolvendo novos procedimentos, este deve dar o seu consentimento livre e esclarecido de tal participação. Este consentimento deve se basear na compreensão da natureza e risco do tratamento, aparelho ou procedimento. É responsabilidade do coordenador da pesquisa fornecer, ao indivíduo que fará parte da pesquisa, as informações necessárias para esta compreensão. Assim, pedimos por meio deste, o seu consentimento para participação nesta pesquisa.

Procedimentos a serem realizados: O espermograma é o exame realizado de rotina na pesquisa de todos os casos de infertilidade masculina. Após a realização do espermograma, o restante do material será utilizado para as técnicas a serem realizadas no presente experimento.

Procedimentos rotineiros: O sêmen será colhido por masturbação e esta amostra será utilizada para a realização do espermograma no laboratório de Urologia/Reprodução Humana da Escola Paulista de Medicina/UNIFESP (Hospital São Paulo). Nós gostaríamos de obter a sua permissão para incluí-lo nesta pesquisa. Para tanto, você deve consentir que nós utilizemos a amostra de sêmen, somente após a realização completa do seu espermograma (não sendo, portanto, prejudicado seu exame).

Riscos e Desconforto: A colheita de sêmen deve ser realizada por masturbação em um recipiente plástico estéril. Este procedimento pode causar algum desconforto para você, porém, não possui nenhum tipo de risco. A colheita de sêmen na sala de colheita do Laboratório de Urologia/Reprodução Humana do Hospital São Paulo pode ser constrangedora. O deslocamento até o local para a colheita também poderá ser inconveniente. Não haverá qualquer ajuda financeira para as despesas de transporte ou alimentação durante a sua estadia. Não existe risco de que a amostra de sêmen que você irá produzir possa gerar filhos. A amostra será utilizada somente para o espermograma e, o restante, para os testes envolvidos nesta pesquisa.

Benefícios: Não existem benefícios para você em particular neste estudo.

Tratamentos ou Procedimentos Alternativos: Não existem tratamentos ou procedimentos alternativos ao qual você possa optar, entretanto, você pode escolher por não participar deste estudo.

Esclarecimento sobre a pesquisa: Em qualquer etapa deste estudo você terá livre acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. A principal investigadora a ser procurada é a Larissa Berloff Belardin que pode ser encontrada no seguinte endereço: Rua Embaú, 231 - Centro de Pesquisa em Urologia. Telefone: 3807- 4062. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) - Rua Botucatu, 572 - 1º andar - cj 14, 5571-1062, FAX: 5539-7162 - e-mail: cepunifesp@epm.br.

Participação Voluntária: Sua participação neste estudo é totalmente voluntária. A sua recusa em participar não prejudicará em nada o seu tratamento futuro ou os benefícios oferecidos pela Instituição. Você é livre para deixar de participar deste estudo a qualquer momento, sem que haja qualquer penalidade ou prejuízo no tratamento médico.

Confidencialidade: As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes e a confidencialidade de todos os seus registros será mantida; entretanto, a Escola Paulista de Medicina/UNIFESP e o Ministério da Saúde poderão encaminhar os seus registros se necessário.

Dúvidas sobre a Pesquisa: Se você tiver qualquer dúvida sobre a pesquisa ou desenvolver qualquer problema relacionado a ela, você deverá entrar em contato com a pesquisadora principal Larissa Berloff Belardin, que pode ser encontrada no laboratório na Rua Embaú, 231; telefone: 3807- 4062.

Despesa e Compensação: Não serão cobertas despesas pessoais de participantes desta pesquisa em qualquer fase do estudo incluindo exames, procedimentos, consultas e hospitalização. Também não há compensação financeira pela sua participação. Você deverá arcar com todas as suas despesas pessoais vinculadas à sua participação nesta pesquisa.

Danos relacionados à pesquisa: Se você for vítima de qualquer lesão física em decorrência desta pesquisa haverá tratamento médico disponível. Não haverá compensação de nossa parte por perda de dia de trabalho, desconto de salário ou perdas indiretas por eventuais danos causados por esta pesquisa.

Compromisso do pesquisador: O material coletado será de uso único e específico para a realização da referida pesquisa, sendo esse um compromisso assumido pelo pesquisador principal.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo "Validação um painel de biomarcadores proteicos no plasma seminal de adolescentes com e sem varicocele". Eu discuti com a pesquisadora Larissa Berloff Belardin sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

_____ / ____ / ____

Assinatura do paciente/representante legal*

* Para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

_____ / ____ / ____

Assinatura da testemunha

(Somente para o responsável do projeto)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

_____ / ____ / ____

Assinatura do responsável

Anexo 5 – Protocolo completo da técnica de *Western blotting*.

1) Soluções a serem preparadas antes de iniciar o *Western blotting*:

A) Solução Estoque de Acrilamida 30:0,8

B) 1,5 M Tris-HCl - pH 8,8

C) 0,5 M Tris-HCl – pH 6,8

D) 10% SDS

2) Preparo do mini-gel

Laemmli gel 10% (2 géis):	Stacking gel 4% (2 géis):
9 mL acrilamida estoque (Solução A)	560 µL de acrilamida estoque (Solução A)
6,75 mL de 1,5M Tris-HCl (Solução B)	420 µL de 0,5M Tris-HCl (Solução C)
270 µL de SDS 10% (Solução D)	33,4 µL de SDS 10% (Solução D)
9,89 mL de água Milli-Q	2280 µL de água Milli Q
135 µL de APS*	16,7µL de APS*
9 µL de Temed	2,5 µL de Temed

*0,1g APS para 1 mL de água Milli Q.

3) Preparo da amostra:

2x treatment buffer (tampão de amostra + azul de bromofenol):

Reagentes	[Final]	Volume ou massa
0,5 M Tris-HCl (pH 6,8)	0,125 M	2,5 mL (2500 µL)
10% SDS	4%	4mL

Glicerol	20%	2mL
Azul de bromofenol	0,02%	2mg
Água		Completar para 10 mL

No momento do uso colocar Beta-mercaptoetanol (5%)

A partir dos dados obtidos do BCA, fazer as contas para obter 50 µg de proteína por poço:

[média] de proteína na amostra x 80 (no BCA diluiu para 80 µL de água)

50 µg x 1000/ resultado obtido acima = resultado em µl

Para a solução final: mesmo volume de *treatment buffer* e amostra diluída em água:

Ex.: 1,43 µl de amostra de plasma + 13,57 µl de água+ 15 µl de 2x treatment buffer = 30 µl no total.

Após o preparo das amostras aquecê-las em banho seco à 100°C por 5 minutos e logo após esse tempo colocar as amostras no gel. Colocar 5 µL do marcador de massa no primeiro poço (ex: *Full range Rainbow*) e nos demais colocar 15 µL de amostra.

4) Solução de eletroforese para SDS-PAGE (10X *electrophoresis running buffer*):

Reagentes	[Final]	V ou massa
Tris	0,25 M	30,2 g
Glicina	1,92 M	144 g
Água		Completar para 1L

No momento do uso, adicionar 150 mL da solução, 1,5 g de SDS e completar o volume para 1,5L de água. Assim, a solução de trabalho terá concentração final de 0,025 M Tris, 0,192 M de glicina, 0,1% SDS.

5) Corrida:

Fazer a eletroforese com a tensão de 50 V e 400 mA (corrente livre) por 30 minutos e, depois subir para 150V e 400mA.

6) Transferência para membrana de nitrocelulose:

Para fazer a solução de *Towbin Buffer* (solução de transferência), utilizar 50 mL da solução para SDS-PAGE (10x *electrophoresis running buffer*), 0,5 g de SDS e completar o volume para 400 mL de água, após agitar a solução, passar para uma proveta e completar o volume para 500 ml de metanol.

Colocar na geladeira para a transferência. Transferência de 1h e 30 minutos a 25V/200mA

Após a transferência colocar a membrana de nitrocelulose em um frasco com 20 mL de TTBS 1x por 5 minutos em *Shaker*.

Transferir deste recipiente para outro com 20 mL de *blocking buffer* por 1h no *shaker* (temperatura ambiente) ou *overnight* (geladeira). (*Blocking buffer* 3%: 1,5 g de BSA + 50 ml de TTBS).

7) Anticorpos:

Diluir o anticorpo primário, de acordo com as recomendações do fabricante, em *blocking buffer*; Agitar em *shaker overnight* a 4 °C na geladeira ou por 2h em temperatura ambiente; Após esse tempo fazer 3 lavagens de 10 minutos cada em TTBS (20 mL);

Diluir o anticorpo secundário, de acordo com o fabricante e com o tipo de ECL a ser utilizado, em *blocking buffer* e agitar em *shaker* por 1h; após esse tempo fazer 3 lavagens em TTBS de 10 minutos cada.

8) Leitura + ECL:

Corar com ECL (500 µl de sol. A + 500 µl de sol. B) por 1 minuto. Após a leitura a membrana pode ser lavada por 5 minutos com TTBS e ser deixada para secar e ser congelada, para utilizar novamente.