Mariana Pereira Antoniassi

ESTUDO DAS ALTERAÇÕES MOLECULARES NO PLASMA SEMINAL ASSOCIADAS AO TABAGISMO

Tese apresentada à Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina, para obtenção do título de Doutor em Ciências.

São Paulo, 2018

Mariana Pereira Antoniassi

ESTUDO DAS ALTERAÇÕES MOLECULARES NO PLASMA SEMINAL ASSOCIADAS AO TABAGISMO

Tese apresentada à Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina, para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Orientador:
Prof. Dr. Ricardo Pimenta Bertolla

São Paulo, 2018

Pereira Antoniassi, Mariana

Estudo das alterações moleculares no plasma seminal associadas ao tabagismo / Mariana Pereira Antoniassi. -- São Paulo, 2018.

xiii,106 f.

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

Título em inglês: Study of molecular alterations in seminal plasma associated with smoking.

1.Tabagismo. 2.Infertilidade masculina. 3.Inflamação. 4.Proteínas. 5. *Heat-shock proteins*

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO
ESCOLA PAULISTA DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM UROLOGIA

Chefe do Departamento de Cirurgia: Prof. Dr. José Carlos Costa Baptista Silva

Coordenador do Programa de Pós-graduação em Urologia: Prof. Dr. Ricardo Pimenta Bertolla

Mariana Pereira Antoniassi

ESTUDO DAS ALTERAÇÕES MOLECULARES NO PLASMA SEMINAL ASSOCIADAS AO TABAGISMO

Presidente da banca:

Prof. Dr. Ricardo Pimenta Bertolla

Banca examinadora:

Profa. Dra. Taiza Stumpp Teixeira

Prof. Dr. Edson Borges Junior

Prof. Dr. João Diego de Agostini Losano

Prof. Dr. Diogo Benchimol de Souza

Suplente:

Prof. Dr. Marcílio Nichi

Prof. Dr. Renato Fraietta

Agradecimentos

Ao **Prof. Dr. Ricardo Pimenta Bertolla**, pela oportunidade e pela aprendizagem na realização deste trabalho e na influência para o meu amadurecimento intelectual e consciência crítica.

Ao **Prof. Dr. Agnaldo Pereira Cedenho**, Chefe da Disciplina de Urologia, pela oportunidade de desenvolver este projeto.

Aos profissionais do *The MiamiProject to CureParalysis,* da Universidade de Miami (EUA), **Nancy Brackett**, **Charles Lynne**, **Emad Ibrahim** e **Sonny Aballa** pelo acolhimento, amizade e ensinamentos ao longo dos sete meses em que desenvolvi meu doutorado sanduíche.

Aos profissionais do Laboratório de Andrologia **Danielle Tibaldi**, **Valéria Barradas**, **Carolina Homsi** e **Raimundo Gonçalves Moreira**, pela disponibilidade em ajudar na obtenção das amostras deste estudo.

À **Larissa Berloffa Belardin, Maria Beatriz Andrade**, **Mariana Camargo** e **Paula Intasqui**, pela amizade e companheirismo desde o início, pela ajuda na realização dos experimentos e nas dúvidas recorrentes, e pelo incentivo incondicional na realização do meu trabalho.

A todos os Pós-Graduandos e membros das Iniciações Científicas do Centro de Pesquisa em Urologia da UNIFESP, que direta ou indiretamente colaboraram para a realização deste trabalho.

Ao meu marido **Eduardo**, pelo apoio e companheirismo em todos os momentos da minha vida.

Aos meus pais **Renato e Celina e meu imão Vinícius**, por terem me proporcionado toda base educacional necessária e por me ensinarem a jamais desistir dos meus ideais.

Ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)**, à **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)**, e à **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES-PDSE)**, sem os quais não seria possível realizar esta pesquisa.

“Discovery is to see what everyone else has seen and to think what no one else has thought”

Albert von Szent-Györgyi Nagyrapolt

1937 Nobel Laureate in Medicine

Sumário

Lista de figuras ix
Lista de tabelas xi
Resumo xii
Abstract xiii
INTRODUÇÃO 1
Estudo 1 –Análise de proteínas seminais inflamatórias em tabagistas 4
1 INTRODUÇÃO 5
2 OBJETIVO 7
3 MÉTODO 8
3.1 Pacientes 8
3.2 Desenho experimental 9
3.3 Análise das proteínas 10
3.4 Análise estatística 14
4 RESULTADOS 15
5 DISCUSSÃO 21
6 CONCLUSÃO 25
Estudo 2 – Expressão de mediadores inflamatórios no plasma seminal de homens tabagistas 27
1 INTRODUÇÃO 27
2 OBJETIVO 29
3 MÉTODO 30
3.1 Pacientes 30
3.2 Desenho experimental 31
3.3 Análise por *Western blotting* 32
3.4 Ensaio *ELISA* 36
3.5 Análise estatística 37
4 RESULTADOS 38
5 DISCUSSÃO 51
6 CONCLUSÃO 55
Estudo 3 – Avaliação dos níveis de expressão de *heat shock proteins* no plasma seminal de homens tabagistas 57
1 INTRODUÇÃO 57
2 OBJETIVO 59
3 MÉTODO 60
3.1 Pacientes 60
3.2 Desenho experimental 61
3.3 Análise da expressão de proteínas por ensaio Multiplex 62
3.4 Análise estatística 63
4 RESULTADOS 64
5 DISCUSSÃO 67
6 CONCLUSÃO 71
CONSIDERAÇÕES FINAIS 72
REFERÊNCIAS 75
BIBLIOGRAFIA CONSULTADA 92

Lista de figuras

Figura 1: Desenho experimental do estudo 1- Análise confirmatória de proteínas seminais inflamatórias em tabagistas..... 9

Figura 2: Análise dos níveis seminais da proteína S100A9 nos grupos controle e tabagista. Imagem dos resultados de Western blotting, analisados por quimioluminescência. Box-plot da porcentagem de proteína total, concentração no sêmen (valor por mL de sêmen) e do nível total no ejaculado (concentração multiplicada pelo volume ejaculado). u.a. – unidades arbitrárias; * - diferença estatisticamente significativa; °- outlier (p<0,05, teste de *Mann-Whitney*)..... 19

Figura 3: Análise dos níveis seminais da proteína SCGB2A1 nos grupos controle e tabagista. Imagem dos resultados de Western blotting, analisados por quimioluminescência. Box-plot da porcentagem de proteína total, concentração no sêmen (valor por mL de sêmen) e do nível total no ejaculado (concentração multiplicada pelo volume ejaculado). u.a. – unidades arbitrárias; * - diferença estatisticamente significativa; °- outlier (p<0,05, teste t de *Student*)..... 20

Figura 4: Complexo inflamassomo..... 28

Figura 5: Desenho experimental do estudo 2 - Expressão de mediadores inflamatórios no plasma seminal de homens tabagistas..... 31

Figura 6: Análise dos níveis seminais da proteína ASC nos grupos controle e tabagista. Imagem dos resultados de Western blotting, analisados por quimioluminescência. Box-plot da porcentagem de proteína total, concentração no sêmen (valor por mL de sêmen) e do nível total no ejaculado (concentração multiplicada pelo volume ejaculado). u.a. – unidades arbitrárias; * - diferença estatisticamente significativa; °- outlier (p<0,05, teste de t de *Student*)..... 44

Figura 7: Análise dos níveis seminais da proteína Pannexin-1 nos grupos controle e tabagista. Imagem dos resultados de Western blotting, analisados por quimioluminescência. Box-plot da porcentagem de proteína total, concentração no sêmen (valor por mL de sêmen) e do nível total no ejaculado (concentração multiplicada pelo volume ejaculado). u.a. – unidades arbitrárias; * - diferença estatisticamente significativa; °- outlier (p<0,05, teste de *Mann-Whitney*)..... 45

Figura 8: Análise dos níveis seminais da proteína NLRP3 nos grupos controle e tabagista. Imagem dos resultados de Western blotting, analisados por quimioluminescência. Box-plot da porcentagem de proteína total, concentração no sêmen (valor por mL de sêmen) e do nível total no ejaculado (concentração multiplicada pelo volume ejaculado). u.a. – unidades arbitrárias; * - diferença estatisticamente significativa; °- outlier (p<0,05, teste de t de *Student)*..... 46

Figura 9: Análise dos níveis seminais da proteína P2X7 nos grupos controle e tabagista. Imagem dos resultados de Western blotting, analisados por quimioluminescência. Box-blot da porcentagem de proteína total, concentração no sêmen (valor por mL de sêmen) e do nível total no ejaculado (concentração multiplicada pelo volume ejaculado). u.a. – unidades arbitrárias; * - diferença estatisticamente significativa; °- outlier (p<0,05, teste de t de *Student*)..... 47

Figura 10: Análise dos níveis seminais da citocina Caspase-1 nos grupos controle e tabagista. Box-plot da concentração no sêmen (valor por mL de sêmen) e do nível total no ejaculado (concentração multiplicada pelo volume ejaculado). u.a. – unidades arbitrárias; * - diferença estatisticamente significativa; °- outlier (p<0,05, teste de t de *Student)*..... 48

Figura 11: Análise dos níveis seminais da citocina IL-18 nos grupos controle e tabagista. Box-plot da concentração no sêmen (valor por mL de sêmen) e do nível total no ejaculado (concentração multiplicada pelo volume ejaculado). u.a. – unidades arbitrárias; * - diferença estatisticamente significativa; °- outlier (p<0,05, teste de t de *Student*)..... 49

Figura 12: Análise dos níveis seminais da citocina IL-1β nos grupos controle e tabagista. Box-plot da concentração no sêmen (valor por mL de sêmen) e do nível total no ejaculado (concentração multiplicada pelo volume ejaculado). u.a. – unidades arbitrárias; * - diferença estatisticamente significativa; °- outlier (p<0,05, teste de t de *Student*)..... 50

Figura 13: Desenho experimental do estudo 3 - Avaliação dos níveis de expressão de heat shock proteins no plasma seminal de homens tabagistas..... 61

Lista de tabelas

Tabela 1: Idade e qualidade seminal de tabagistas e controles incluídos no estudo 1..... 15

Tabela 2: Análise dos níveis seminais da proteína S100A9 nos grupos controle e tabagista…… 16

Tabela 3: Análise dos níveis seminais da proteína Mammaglobin-B nos grupos controle e tabagista……..... 17

Tabela 4: : Idade e qualidade seminal de tabagistas e controles incluídos no estudo 2..... 39

Tabela 5: Análise dos níveis seminais da proteína ASC nos grupos controle e tabagista……... 40

Tabela 6: Análise dos níveis seminais da proteína Pannexin-1 nos grupos controle e tabagista…… 41

Tabela 7: Análise dos níveis seminais das proteínas NLRP3 e P2X7R nos grupos controle e tabagista…….. 42

Tabela 8: Análise dos níveis seminais da caspase-1, interleucina 18 e interleucina 1 β nos grupos controle e tabagista…….. 43

Tabela 9: Idade e qualidade seminal de tabagsitas e controles incluídos no estudo 3..... 65

Tabela 10: Expressão das proteínas HSP 27 (total), HSP (pS78/pS82), HSP 60, HSP 70 e HSP 90 alpha nos grupos controle e tabagista..... 66

Resumo

Objetivo: A composição do plasma seminal pode refletir alterações testiculares importantes causadas pelo tabagismo. Sendo assim, a análise da composição proteica do plasma seminal torna-se um recurso de avaliação dessas alterações. Portanto o objetivo desse estudo foi avaliar proteínas do plasma seminal de homens tabagistas relacionadas à inflamação, ao complexo inflamassomo e às *heat-shock proteins*. **Métodos:** Este trabalho foi dividido em 3 estudos. No estudo 1, amostras seminais de 59 pacientes controle e 39 tabagistas foram utilizadas. Após a coleta e liquefação do sêmen, uma alíquota foi utilizada para a análise seminal e o volume remanescente foi centrifugado para a separação do plasma seminal. Este foi então utilizado para a avaliação dos níveis seminais das proteínas sugeridas, por *Western blotting*: S100A9 para o grupo tabagista e a SCGB2A1 para o grupo controle. No estudo 2, amostras seminais de 37 pacientes controle e 41 tabagistas foram utilizadas. Após a coleta e liquefação do sêmen, uma alíquota foi utilizada para a análise seminal e o volume remanescente foi centrifugado para a separação do plasma seminal. Este foi então utilizado para a avaliação dos níveis seminais das proteínas do complexo inflamassomo, por *Western blotting* (ASC, NLRP3, Pannexin-1, P2X7), e das citocinas, por *ELISA* (Caspase-1, IL-18 e IL-1β). No estudo 3, amostras seminais de 30 pacientes controle e 31 tabagistas foram utilizadas. Após a coleta e liquefação do sêmen, uma alíquota foi utilizada para a análise seminal e o volume remanescente foi centrifugado para a separação do plasma seminal. Este foi então utilizado para a avaliação da expressão de *heat shock proteins* (HSP) pelo ensaio *Multiplex.* **Resultados:** No estudo 1, o nível seminal das proteínas S100A9 e SCGB2A1 estava aumentado no grupo tabagista. No estudo 2, o nível seminal da proteína ASC e da citocina IL-18 estava aumentado no grupo tabagista. As proteínas NLRP3, Pannexin-1, P2X7, bem como as citocinas Caspase-1 e IL-1β não diferiram entre os grupos. No estudo 3, o grupo tabagista apresentou uma diminuição nos níveis seminais de HSP 90 alpha. **Conclusão:** As proteínas do plasma seminal de homens tabagistas refletem o perfil inflamatório presente nesses pacientes.

Palavras-chave: tabagismo; infertilidade masculina; inflamação; proteínas, *heat-shock proteins*

Abstract

Objective: The composition of seminal plasma may reflect significant testicular changes caused by smoking. Thus, the analysis of the protein composition of the seminal plasma becomes a resource to evaluate these alterations. Therefore, the objetive of this study was to evaluate seminal plasma proteins in smokers related to inflammation, inflammasome complex and heat-shock proteins. **Methods:** This study was divided into three studies. In study 1, seminal samples from 59 controls and 39 smokers were used. After semen collection and liquefaction, an aliquot was used for the seminal analysis and the remaining volume was centrifuged for seminal plasma separation. Seminal plasma was then used to evaluate the seminal levels of the proteins suggested, by Western blotting: S100A9 for the smoking group and SCGB2A1 for the control group. In study 2, seminal samples from 37 control patients and 41 smokers were used. After semen collection and liquefaction, an aliquot was used for the seminal analysis and the remaining volume was centrifuged for seminal plasma separation. Seminal plasma was then utilized to evaluate the seminal levels of the inflammasome complex proteins by Western blotting (ASC, NLRP3, Pannexin-1, P2X7) and cytokines by ELISA (Caspase-1, IL-18 and IL-1β). In study 3, seminal samples from 30 control patients and 31 smokers were used. After semen collection and liquefaction, an aliquot was used for the seminal analysis and the remaining volume was centrifuged for seminal plasma separation. Seminal plasma was then utilized to evaluate the expression of heat shock proteins (HSP) by the Multiplex assay. **Results:** In study 1, seminal levels of S100A9 and SCGB2A1 proteins was increased in the smoking group. In study 2, seminal levels of ASC protein and IL-18 cytokine was increased in the smoking group. The NLRP3, Pannexin-1, P2X7 proteins, as well as the Caspase-1 and IL-1β cytokines did not differ between the groups. In study 3, the smoking group showed a decrease in the seminal levels of HSP 90 alpha. **Conclusion:** The seminal plasma proteins of smokers reflect the inflammatory profile present in these patients.

Keywords: smoking; male infertility; inflammation; proteins; heat-shock proteins

INTRODUÇÃO

A infertilidade é definida como ausência de gravidez em um casal que mantém relações sexuais frequentes bem distribuídas ao longo do ciclo menstrual e sem o uso de qualquer método contraceptivo, por no mínimo um ano (1). Cerca de 10% a 15% dos casais em idade reprodutiva apresentam problemas de infertilidade, sendo que o fator masculino está presente em até 50% dos casos (2).

Dentre os principais fatores etiológicos de infertilidade masculina, têm recebido especial destaque aqueles relacionados aos fatores ambientais e ao estilo de vida, como poluição, etilismo, sedentarismo e tabagismo (3). Segundo a Organização Mundial da Saúde, um terço da população com idade superior a quinze anos utiliza o cigarro no mundo. O tabagismo está associado a diversos riscos ao corpo humano e sabe-se que, em homens e mulheres, este afeta a saúde reprodutiva mais intensamente que o álcool ou a cafeína (4). No Brasil, 18,1% da população masculina com mais de 18 anos é tabagista, sendo que 5,4% dos homens fumam 20 ou mais cigarros por dia (5). Portanto, chama-se a atenção para o tabagismo, pois ele pode constituir de fato um efeito epidemiológico na infertilidade masculina.

O cigarro possui efeito prejudicial na qualidade seminal resultando na diminuição da concentração de espermatozoides e na porcentagem de células com motilidade progressiva e morfologia normal (6–11). O tabagismo também é associado a um aumento nos níveis de fragmentação do DNA (9,10,12–14) e a uma diminuição na atividade mitocondrial dos espermatozoides, bem como a um aumento na peroxidação lipídica seminal (9). Além disso, ele também pode afetar a espermatogênese por alterar a concentração de hormônios reprodutivos (15), como a testosterona, LH e o FSH, sugerindo que os componentes do cigarro podem atuar como disruptores endócrinos (16,17). Ainda, o tabagismo já foi relacionado à elevação na frequência de aneuploidias (18) e defeitos de protaminação em espermatozoides (19) e ao aumento da concentração de citocinas no plasma seminal de pacientes inférteis (20). Outros estudos ainda demonstram que as citocinas podem estar associadas a fragmentação de DNA (21).

Todavia, apesar de observarmos uma baixa qualidade funcional dos espermatozoides em diferentes situações, os mecanismos moleculares e as vias pós-genômicas por meio dos quais o tabagismo se associa à diminuição da qualidade seminal ainda não estão esclarecidos. Em tabagistas, algumas alterações no perfil proteômico do plasma seminal de homens com e sem varicocele foram encontradas em relação a homens não tabagistas (9,22). Este tipo de estudo é caracterizado por não partir de um alvo (*untargeted*) ou de uma via específica (*unbiased*), mas de utilizar uma abordagem que permite a visualização do proteoma de uma maneira completa. Com isso, estes estudos geram uma lista de proteínas a partir de uma pergunta biológica (dirigida por hipóteses) ao mesmo tempo que geram novas hipóteses (23).

O plasma seminal constitui o componente líquido do sêmen e é composto por lipídeos, proteínas, açúcares e metabólitos, essenciais para o metabolismo celular (24). As proteínas estão presentes abundantemente em uma concentração que varia entre 35-55 g/L (33) e o estudo delas é de grande importância, já que estas podem se ligar ao espermatozoide e atuar na sua sobrevivência (26,27), na regulação da motilidade (36–38), da capacitação (35,39), da resposta imune no trato reprodutivo feminino (40), transcrição e compactação da cromatina (33,34), na fusão do espermatozoide com o oócito (35,36) e no desenvolvimento embrionário (37). As principais funções das proteínas do plasma seminal são ligação ao espermatozoide e/ou oócito, atividade catalítica e transdução do sinal (25,38).

O proteoma, conjunto de proteínas expressas por um genoma, tem sido de grande importância para identificar e validar potenciais marcadores moleculares que possam implementar condições diagnósticas (39). A maioria das proteínas do plasma seminal se originam nas vesículas seminais e na próstata e cerca de 11% da composição proteica é proveniente dos testículos e epidídimos (40). Assim, o proteoma do plasma seminal reflete diretamente a espermatogênese e a maturação no epidídimo. Portanto, é possível hipotetizar que alterações nesses processos causadas pelo tabagismo podem alterar a composição proteica do plasma seminal. Além disso, devido à inflamação sistêmica causada pelo tabagismo (41), a secreção de proteínas pelas glândulas sexuais masculinas também pode estar alterada, refletindo em alterações no plasma seminal.

Baseado nessas informações, um estudo anterior do nosso grupo realizou a análise proteômica do plasma seminal de homens tabagistas comparados a homens não tabagistas. Foram identificadas 422 proteínas, das quais 1 era exclusiva e 27 hiperexpressas no grupo controle e 6 estavam hiperexpressas no grupo tabagista. Naquele estudo, a análise do enriquecimento funcional permitiu observar enriquecidas as funções de imunidade inata e resposta ao estresse. Então, a partir dessas proteínas foi realizada a estatística multivariada, e com as 15 principais proteínas do modelo nós realizamos a análise discriminante. Como resultado dessa análise, a proteína S100A9 foi capaz de predizer o grupo tabagista e a Mammaglobin-B foi capaz de predizer o grupo controle (14). Portanto, como desdobramento daquele estudo, algumas perguntas permaneceram:

1. Como essas proteínas foram geradas pela abordagem *shotgun*, esses resultados de diferença quantitativa podem ser confirmados?
2. Qual o papel da imunidade inata no perfil inflamatório seminal desses pacientes?
3. Os pacientes apresentam algum tipo de resposta seminal ao efeito do tabagismo?

Portanto, dividimos este trabalho em três estudos, com foco na população masculina tabagista: análise confirmatória de proteínas seminais inflamatórias, expressão de mediadores inflamatórios no plasma seminal e avaliação dos níveis de expressão de *heat shock proteins* no plasma seminal.

ESTUDO 1

Análise confirmatória de proteínas seminais inflamatórias em tabagistas

1 INTRODUÇÃO

Com a mudança no estilo de vida da população mundial nos últimos 40 anos, dados de que o meio ambiente pode afetar a saúde reprodutiva masculina têm recebido destaque, principalmente fatores como a obesidade, o tabagismo, etilismo e a poluição (3). Estudos sobre os efeitos do tabagismo na qualidade seminal ainda apresentam resultados controversos, e embora muitos demonstrem relação entre o tabagismo e diminuição da concentração, morfologia e motilidade dos espermatozoides, (9,13,15,42,43) outros não observam essa relação (16,44,45). Ademais, devemos reforçar que, apesar de os testes laboratoriais comuns avaliarem a qualidade do sêmen e trazerem informações iniciais importantes, nenhum pode informar com especificidade e sensibilidade se um homem é ou não fértil (46). Sendo assim, o uso de novas abordagens e tecnologias tem sido de grande importância na tentativa de se esclarecer novos mecanismos associados a alterações no plasma seminal. Alterações nos mecanismos funcionais (celulares) já foram descritas, (12,47), porém os mecanismos moleculares ainda necessitam ser complementados para o melhor entendimento dessas vias (48). Diversos estudos demonstraram uma relação entre infertilidade e alterações no proteoma (49–54) assim como uma associação com a qualidade funcional de espermatozoides (55,56).

Nesse contexto, um estudo anterior do nosso grupo realizou a análise do perfil proteômico do plasma seminal em homens tabagistas (22). Os homens foram divididos em dois grupos: controles não tabagistas e pacientes tabagistas. Após a coleta, as amostras foram utilizadas para a realização do espermograma e da análise proteômica do plasma seminal. Com os resultados da comparação do perfil proteômico do plasma seminal entre os grupos, foram selecionadas duas proteínas diferencialmente expressas, descritas no quadro 1.

Quadro 1. Proteínas diferencialmente expressas no plasma seminal de homens tabagistas, encontradas após análise proteômica e análise estatística multivariada.

Grupo controle		Grupo tabagista	
UniProt AC	**Nome da proteína (Nome do gene)**	**UniProt AC**	**Nome da proteína (Nome do gene)**
O75556	*Mammaglobin-B (SCGB2A1)*	P06702	*Protein S100-A9 (S100A9)*

Como as técnicas de proteômica *shotgun* possuem uma capacidade de identificação de peptídeos e proteínas com elevada confiança, mas as informações de quantificação apresentam variação excessiva (em torno de 30%), são necessários estudos confirmatórios utilizando técnicas clássicas, como o *Western blotting.* Com essa avaliação confirmatória, é possível construir uma relação entre a expressão dessas proteínas no plasma seminal e o tabagismo (57,58). Com isso, novos métodos não invasivos de análise da qualidade seminal poderão ser desenvolvidos na tentativa de identificar precocemente algum dano no sêmen desses pacientes expostos a algum tipo de agente externo, como o abordado neste estudo. Ou ainda, elucidar possíveis mecanismos pelos quais o tabagismo altera o perfil proteômico seminal. Sendo assim, a hipótese do deste estudo é de que essas duas proteínas seminais possuem seus níveis alterados em homens tabagistas.

2 OBJETIVOS

O objetivo deste estudo foi analisar os níveis seminais das proteínas S100A9 e Mammaglobin-B em tabagistas.

3 MÉTODO

3.1 Pacientes

Este estudo foi realizado no Departamento de Cirurgia, Disciplina de Urologia da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP) e foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa dessa Universidade (CAAE:43590015.7.0000.5505). Todos os homens incluídos neste estudo assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido. Este estudo foi financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), por meio de bolsa de doutorado (processo número 140995/2016-1).

Foi realizado um estudo transversal incluindo pacientes com idade entre 20 e 50 anos que procuraram o Laboratório de Andrologia do Setor de Reprodução Humana da Disciplina de Urologia, Departamento de Cirurgia, da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP). As coletas seminais foram realizadas após a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) pelos pacientes. Os pacientes foram divididos em dois grupos: pacientes tabagistas e pacientes controle.

Durante a avaliação clínica dos pacientes ou voluntários, realizada por médicos do setor, um questionário foi preenchido para cada indivíduo, incluindo dados sobre estilo de vida, índice de massa corpórea (IMC), presença ou ausência de varicocele e histórico médico. A varicocele foi diagnosticada por exame físico, incluindo palpação escrotal em sala com temperatura (>23 °C) e iluminação adequadas, com o homem em posição ortostática. Na presença de varicocele, esta foi classificada de acordo com Dubin e Amelar (59) em: grau I (dilatação do cordão espermático palpável apenas com a manobra de Valsalva), grau II (dilatação do cordão espermático facilmente palpável, demonstrando-se acentuado enchimento venoso durante a manobra de Valsalva) ou grau III (dilatação volumosa do cordão espermático facilmente visualizada e ectasia intensificada durante manobra de Valsalva). Com base nesse questionário, foram selecionados os indivíduos que participaram deste estudo, os quais coletaram as amostras seminais por masturbação, com dois a cinco dias de abstinência ejaculatória e em recipientes de polipropileno estéreis (60).

Para o grupo controle, foram selecionados homens com volume ejaculado ≥ 1,5 mL, concentração de espermatozoides ≥ $15x10^6$/mL de sêmen, motilidade progressiva ≥ 32%, morfologia estrita ≥ 4% e concentração de leucócitos inferior a $1x10^6$/mL de sêmen. Para o grupo tabagismo, foram incluídos apenas indivíduos que usavam ao menos 10 cigarros por dia. Os fatores de exclusão para ambos os grupos foram: obesidade, varicocele, histórico de febre num período de noventa dias anterior à coleta do sêmen, evidências de infecção urogenital, uso de drogas de abuso e histórico de câncer e cirurgias no trato urogenital ou endocrinopatias.

3.2 Desenho experimental

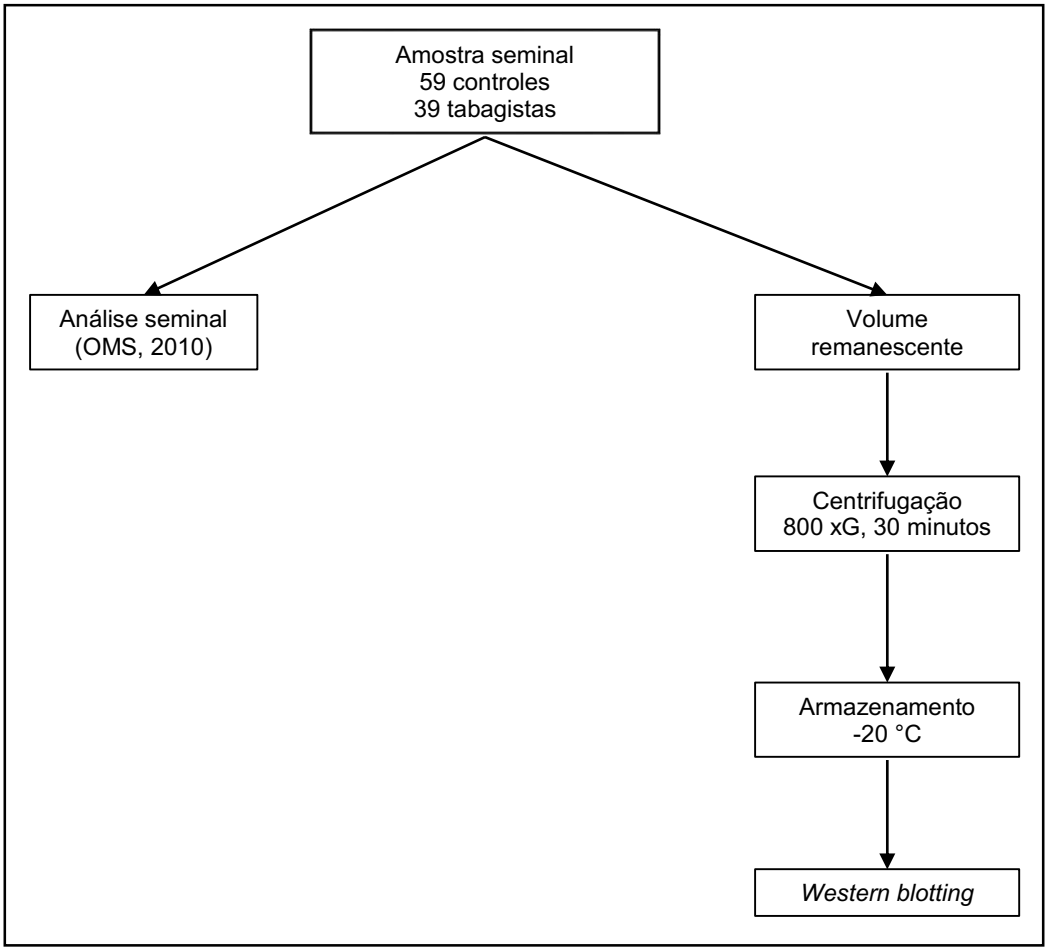

Figura 1: Desenho experimental do estudo 1 - Análise confirmatória de proteínas seminais inflamatórias em tabagistas.

Após a liquefação, uma alíquota do sêmen foi submetida ao espermograma convencional, realizada no Laboratório de Andrologia da UNIFESP, de acordo com as recomendações da Organização Mundial da Saúde de 2010 (1). O volume restante das amostras foi encaminhado ao Centro de Pesquisa em Urologia da UNIFESP para realização da parte experimental. A amostra foi centrifugada a 800 x*G* por 30 minutos e o plasma seminal sobrenadante foi congelado sem adição de crioprotetores e mantido a -20 °C até o momento da quantificação das proteínas. No momento das análises, as amostras foram centrifugadas a 16.000 xG por uma hora a 4 ºC para remover o restante dos debris celulares. Todos os reagentes utilizados neste estudo foram adquiridos da Sigma (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA), a não ser quando descrito.

3.3 Análise das proteínas

Para a análise das proteínas associadas ao tabagismo, foi utilizada a técnica de *Western blotting*. Primeiramente, foi realizada a quantificação de proteínas totais do plasma seminal de cada amostra, utilizando o método de Ensaio de Proteína BCA (Ácido Bicinconínico - Método de Lowry modificado) (61). Esse método consiste na reação das ligações peptídicas das proteínas do plasma seminal reduzindo os íons cobre presentes na solução de sulfato de cobre (II) adicionada à amostra, de maneira temperatura-dependente. Assim, a quantidade de cobre reduzido é proporcional à quantidade de proteína presente na amostra. Posteriormente, duas moléculas de ácido bicinconínico são responsáveis pela quelação de cada íon cobre reduzido, formando um complexo de coloração roxa, produto solúvel em água, o qual pode ser medido por absorbância a 562 nm (61). Para isso, primeiramente, a solução de ácido bicinconínico (Sigma-Aldrich) foi misturada à solução de sulfato de cobre(II) (Sigma-Aldrich), na proporção de 50:1 (v:v). Então, 200 µL dessa solução foram adicionados aos poços de uma microplaca, aos quais 25 µL das amostras diluídas em água na proporção de 1:80 (v:v) foram adicionados, em triplicata. Uma curva padrão contendo diferentes concentrações de albumina sérica bovina (BSA, 0 a 1.000 µg/mL, Sigma-Aldrich), também foi adicionada, em duplicata. Então, a reação ocorreu por trinta minutos a 37 °C em banho-maria. A quantificação foi imediatamente realizada por espectrofotometria, em leitor de

microplaca (ELx800 *Absorbance Microplate Reader*, BioTek *Instruments*, Vermont, EUA) em um comprimento de onda de 540 nm. As amostras que apresentaram coeficientes de variação maior do que 5% foram quantificadas para assegurar uma maior precisão na quantificação.

Após a quantificação, um volume correspondente a 50 µg de proteínas 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), totalizando 15µL de solução que foi utilizada para a eletroforese em gel de poliacrilamida. Posteriormente, as amostras foram aquecidas a 100 ºC por cinco minutos, e adicionadas a um gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) a 4% para o *stacking* gel e a 10% para o *running* gel. Como marcador de peso molecular, utilizamos o *SeeBlue™ Plus2 Pre-stained Protein Standard*, de 3 a 198 kDa.

A separação das proteínas foi realizada através de eletroforese a 50 V e 400 mA por trinta minutos, em sistema de eletroforese digital (mini VE, GE *Healthcare Bio-Sciences*, Nova Jersey, EUA). Após esse tempo, a tensão foi alterada para 150 V, com corrente livre (400 mA), até as amostras atingirem o final do gel (aproximadamente duas horas e quinze minutos.

Em seguida, as proteínas foram transferidas dos géis para as membranas de nitrocelulose (GE *Healthcare Bio-Sciences*) em sistema úmido (mini VE *Blotter*, GE *Healthcare Bio-Sciences*) por uma hora e trinta minutos a 4 ºC, utilizando-se corrente de 200 mA e tensão de 25 V. Então, as membranas foram lavadas com TPBS (*Phosphate Buffered Saline* [137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 10 mM Na_2HPO_4; 1,8 mM KH_2PO_4], *Tween 20* 0,05% (v:v)) por cinco minutos e bloqueadas com solução de bloqueio (3% BSA [p:v] [VWR Life Science, Ohio, EUA] em TPBS), sob agitação, por uma hora a temperatura ambiente.

Em seguida, as amostras foram incubadas por duas horas, em temperatura ambiente, com os anticorpos primários específicos para as proteínas estudadas, diluídos em solução de bloqueio, lavadas por três vezes de dez minutos cada com TPBS. Em seguida, foram incubadas com o anticorpo secundário conjugado à enzima peroxidase, diluído em solução de bloqueio, por uma hora em temperatura ambiente, seguido de três lavagens de dez minutos

cada, com TPBS. Todas as etapas foram realizadas sob agitação constante. Para cada anticorpo foram padronizadas as seguintes concentrações:

- Anti-S100A9 (SAB2500903, Sigma): solução de bloqueio com BSA 3% em TPBS; anticorpo primário na concentração de 0,5 µg/mL; anticorpo secundário anti-IgG de cabra, na concentração 1:20000 (v:v) (A5420, Sigma).
- Anti-SCGB2A1 (HPA034584, Sigma): solução de bloqueio com BSA 3% em TPBS; anticorpo primário na concentração 1:325 (v:v); anticorpo secundário anti-IgG de coelho, na concentração 1:20000 (v:v) (A0545, Sigma).

Para a detecção por quimioluminescência, foi utilizado o reagente *Enhanced chemiluminescence* (*ECL™ Western blotting Detection Reagents*, GE *Healthcare*), para a posterior revelação por meio do analisador de quimioluminescência ImageQuant LAS4000 (GE *Healthcare*). Para a análise das bandas, foi utilizado o *software* ImageQuant TL 7.0 (GE *Healthcare Life Sciences*, Reino Unido). Quando a proteína apresentou mais de uma banda no *Western blotting*, essas foram analisadas separadamente e tanto os valores individuais de cada banda quanto a soma de todas as bandas foram utilizados para a análise estatística.

Para a incubação de outro anticorpo na mesma membrana, o anticorpo anterior foi removido das membranas, por meio da adição de solução de *stripping* (*Restore™ PLUS Western Blot Stripping Buffer*, por trinta minutos em temperatura ambiente sob agitação constante), seguido de lavagem com PBS-T (1x10 minutos). Então, as membranas foram novamente bloqueadas, incubadas com o anticorpo de interesse, reveladas e analisadas, como descrito anteriormente. Para avaliar se a remoção dos anticorpos foi eficiente, uma membrana foi bloqueada, incubada apenas com o anticorpo secundário e revelada por quimioluminescência.

Para normalização dos dados, foi utilizado o total de proteínas de cada amostra, a fim de se obter um aspecto quantitativo do *Western blotting*, devido a variações experimentais e biológicas (62,63). Para isso, as membranas foram coradas com Ponceau S *solution* (Sigma-Aldrich) por um minuto em agitação e lavadas com água milli-Q até a remoção da coloração de fundo. Então, as

membranas foram digitalizadas no *ImageQuant LAS4000* (GE *Healthcare*) e analisadas no *software ImageQuant TL 7.0* (GE *Healthcare*). A densidade total de cada amostra foi utilizada para a normalização. Assim, para que tanto variações intra- quanto inter-membranas fossem corrigidas, foi calculado um fator de correção (FC) do total de proteínas para cada membrana (cálculo descrito abaixo). Então, o valor do total de proteínas de cada amostra foi dividido pelo FC da sua membrana.

$$FCmembrana = \frac{média\ do\ total\ de\ proteínas\ em\ todas\ as\ amostras\ da\ membrana}{média\ do\ total\ de\ proteínas\ em\ todas\ as\ membranas}$$

$$Total\ de\ proteínas\ corrigido = \frac{total\ de\ proteínas\ da\ amostra}{FCmembrana}$$

3.4 Análise estatística

Para a análise estatística, foi utilizado o *software* PAWS (SPSS) 18.0. Primeiramente, foi realizada a análise estatística descritiva dos dados seminais de cada amostra. Para a comparação destas variáveis entre os grupos, primeiramente, foi avaliada a normalidade da distribuição dos dados pelo teste de *Kolmogorov-Smirnov*. Os grupos foram comparados pelo teste de *Mann-Whitney*.

Para a análise dos níveis seminais das proteínas, o total corrigido das proteínas S100A9 e SCGB2A1 foi multiplicado pelo volume seminal de cada amostra, a fim de obter a concentração das proteínas no plasma seminal (u.a./mL) quanto o nível total de proteínas no ejaculado (u.a. no ejaculado). Os valores corrigidos de cada proteína foram transformados pela raiz quadrada, pois possuíam valores resultantes de menores ordens de grandeza. A normalidade da distribuição dos dados de cada proteína foi avaliada, utilizando-se o teste de *Kolmogorov-Smirnov*. A proteína S100A9 foi comparada pelo teste de *Mann-Whitney* s e a proteína SCGB2A1, pelo teste t de *Student*. Para todos os casos, um alfa de 5% foi adotado.

4 RESULTADOS

Os dados seminais de todos os pacientes estão descritos na Tabela 1. No total, cinquenta e nove pacientes foram incluídos no grupo controle, e trinta e nove no grupo tabagista. O grupo tabagista apresentou uma menor concentração e contagem total de espermatozoides, quando comparado ao grupo controle (p=0,047 e 0,013).

Tabela 1. Idade e qualidade seminal de tabagistas e controles incluídos no estudo.

	Controle (n=59)	Tabagista (n=39)	p
Idade (anos)			
Mediana; IQ	33,0; 7,0	33,0; 7,0	0,626
Q1-Q3	29,0-36,0	30,7-37,0	
Volume ejaculado (mL)			
Mediana; IQ	3,5; 1,6	3,3; 2,0	0,444
Q1-Q3	2,8-4,4	2,4-4,2	
Concentração de espermatozoides (milhões/mL)			
Mediana; IQ	69,2; 70,0	50,9; 71,4	**0,047 ***
Q1-Q3	40,0-111,3	25,1-92,6	
Contagem total de espermatozoides (milhões)			
Mediana; IQ	241,2; 193,4	168,6; 170,10	**0,013***
Q1-Q3	158,4-342,4	82,5-245,2	
Motilidade progressiva dos espermatozoides (%)			
Mediana; IQ	55,0; 14	53,5; 20	0,343
Q1-Q3	45,0-59,0	40,0-60,0	
Motilidade não progressiva dos espermatozoides (%)			
Mediana; IQ	5,0; 5,0	5,0; 2,0	0,503
Q1-Q3	4,0-8,0	4,0-6,0	
Imotilidade dos espermatozoides (%)			
Mediana; IQ	40,0; 13,0	42,0; 21,0	0,226
Q1-Q3	36,049,0	36,0-56,2	
Morfologia dos espermatozoides (% normais)			
Mediana; IQ	6,0; 3,0	5,0; 5,0	0,135
Q1-Q3	5,0-8,0	4,0-8,5	
Células redondas (milhões/mL)			
Mediana; IQ	1,0; 1,5	0,9; 1,1	0,881
Q1-Q3	0,4-1,9	0,5-1,5	
Neutrófilos (milhões/mL)			
Mediana; IQ	0,0; 0,1	0,0; 0,2	0,057
Q1-Q3	0,0-0,1	0,0-0,1	

* Diferença significativa (p<0,05).
IQ: intervalo interquartil
Q1: quartil 1
Q3: quartil 3

Tabela 2: Análise dos níveis seminais da proteína S100A9 nos grupos controle e tabagista. Grupos foram comparados pelo teste de *Mann-Whitney*.

	Controle (n=59)	Tabagista (n=39)	p
S100A9 70 kDa % prot total			
Mediana; IQ	$0,7 \times 10^{-4}$; $2,6 \times 10^{-4}$	$1,7 \times 10^{-4}$; $2,8 \times 10^{-4}$	0,108
S100A9 62 kDa % prot total			
Mediana; IQ	$1,2 \times 10^{-4}$; $4,2 \times 10^{-4}$	$3,7 \times 10^{-4}$; $6,3 \times 10^{-4}$	0,099
S100A9 49 kDa % prot total			
Mediana; IQ	$1,9 \times 10^{-4}$; $3,2 \times 10^{-4}$	$3,3 \times 10^{-4}$; $14,2 \times 10^{-4}$	0,120
S100A9 70 + 62 + 49 kDa % prot total			
Mediana; IQ	$5,7 \times 10^{-4}$; $9,9 \times 10^{-4}$	$11,1 \times 10^{-4}$; $15,2 \times 10^{-4}$	**0,015**
S100A9 70 kDa (u.a./mL no sêmen)			
Mediana; IQ	$4,8 \times 10^{-2}$; 0,1	$9,2 \times 10^{-2}$; 0,1	0,243
S100A9 62 kDa (u.a./mL no sêmen)			
Mediana; IQ	$7,0 \times 10^{-2}$; 0,2	$14,2 \times 10^{-2}$; 0,4	0,215
S100A9 49 kDa (u.a./mL no sêmen)			
Mediana; IQ	$11,1 \times 10^{-2}$; 0,2	$15,8 \times 10^{-2}$; 0,6	0,156
S100A9 70 + 62 + 49 kDa (u.a./mL no sêmen)			
Mediana; IQ	$35,7 \times 10^{-2}$; 0,6	$66,6 \times 10^{-2}$; 1,0	**0,038**
S100A9 70 kDa (u.a./mL no ejaculado)			
Mediana; IQ	$15,0 \times 10^{-2}$; 0,6	$30,8 \times 10^{-2}$; 0,6	0,219
S100A9 62 kDa (u.a./mL no ejaculado)			
Mediana; IQ	$22,6 \times 10^{-2}$; 1,0	$67,3 \times 10^{-2}$; 1,2	0,192
S100A9 49 kDa (u.a./mL no ejaculado)			
Mediana; IQ	$46,0 \times 10^{-2}$; 0,9	$63,4 \times 10^{-2}$; 2,5	0,108
S100A9 70 + 62 + 49 kDa (u.a./mL no ejaculado)			
Mediana; IQ	1,0; 2,7	2,2; 5,0	**0,023**

* Diferença significativa ($p<0,05$).
IQ: intervalo interquartil
u.a.: unidades arbitrárias

Tabela 3: Análise dos níveis seminais da proteína Mammaglobin-B nos grupos controle e tabagista. Grupos foram comparados pelo teste de t de *Student*.

	Controle (n=59)	Tabagista (n=39)	p
Mammaglobin-B 49 kDa % prot total			
Média; DP	$3,6 \times 10^{-4}$; $3,2 \times 10^{-4}$	$3,6 \times 10^{-4}$; $3,9 \times 10^{-4}$	0,820
Mammaglobin-B 38 kDa % prot total			
Média; DP	$8,1 \times 10^{-4}$; $7,6 \times 10^{-4}$	$9,1 \times 10^{-4}$; $6,8 \times 10^{-4}$	0,343
Mammaglobin-B 17 kDa % prot total			
Média; DP	$1,9 \times 10^{-4}$; $2,6 \times 10^{-4}$	$3,2 \times 10^{-4}$; $3,1 \times 10^{-4}$	**0,021**
Mammaglobin-B 49+38+17 kDa % prot total			
Média; DP	$13,7 \times 10^{-4}$; $9,7 \times 10^{-4}$	$16,0 \times 10^{-4}$; $9,5 \times 10^{-4}$	0,239
Mammaglobin-B 49 kDa (u.a./mL no sêmen)			
Média; DP	$2,6 \times 10^{-1}$; $2,6 \times 10^{-1}$	$2,1 \times 10^{-1}$; $2,4 \times 10^{-1}$	0,343
Mammaglobin-B 38 kDa (u.a./mL no sêmen)			
Média; DP	$5,2 \times 10^{-1}$; $5,6 \times 10^{-1}$	$5,3 \times 10^{-1}$; $4,8 \times 10^{-1}$	0,841
Mammaglobin-B 17 kDa (u.a./mL no sêmen)			
Média; DP	$1,1 \times 10^{-1}$; $0,9 \times 10^{-1}$	$1,8 \times 10^{-1}$; $1,9 \times 10^{-1}$	**0,042**
Mammaglobin-B 49+38+17 kDa (u.a./mL no sêmen)			
Média; DP	$8,9 \times 10^{-1}$; $6,4 \times 10^{-1}$	$9,2 \times 10^{-1}$; $6,8 \times 10^{-1}$	0,913
Mammaglobin-B 49 kDa (u.a./mL no ejaculado)			
Média; DP	$9,6 \times 10^{-1}$; 1,14	$7,8 \times 10^{-1}$; 0,9	0,387
Mammaglobin-B 38 kDa (u.a./mL no ejaculado)			
Média; DP	1,8; 2,1	1,9; 1,9	0,817
Mammaglobin-B 17 kDa (u.a./mL no ejaculado)			
Média; DP	$3,8 \times 10^{-1}$; $3,4 \times 10^{-1}$	$6,3 \times 10^{-1}$; $7,0 \times 10^{-1}$	**0,045**
Mammaglobin-B 49+38+17 kDa (u.a./mL no ejaculado)			
Média; DP	3,1; 2,5	3,3; 2,6	0,892

* Diferença significativa ($p<0,05$).
DP: desvio padrão
u.a.: unidades arbitrárias

Com relação aos dados de *Western blotting*, a proteína S100A9 foi avaliada em quarenta e oito pacientes do grupo controle e vinte e nove pacientes do grupo tabagista. Essa proteína apresentou três bandas diferentes na análise por *Western blotting,* uma com 70 kDa, outra com 62 kDa e outra com 49 kDa (Figura 2). A concentração das bandas individuais não apresentou diferenças entre os grupos. Porém, a soma das três bandas, tanto para os valores corrigidos, quanto para os valores no plasma seminal (por mL) e por seu nível total no ejaculado, apresentaram-se maiores no grupo tabagista (p= 0,015, 0,038 e 0,023), corroborando os dados obtidos na análise proteômica *shotgun*.

Para os dados da proteína Mammaglobin-B, foram avaliados quarenta e oito pacientes do grupo controle e vinte e sete do grupo tabagista. Essa proteína apresentou três bandas diferentes na análise por *Western blotting,* uma com 49 kDa, outra com 38 kDa e outra com 17 kDa (massa esperada) (Figura 3). A concentração da banda de 17 kDa apresentou-se maior no grupo tabagista, tanto para os valores corrigidos, quanto para os valores no plasma seminal (por mL) e por seu nível total no ejaculado (p= 0,021, 0,042 e 0,045). Para as demais bandas individuais, não houve diferenças entre os grupos, bem como a soma das três bandas, tanto para os valores corrigidos, quanto para os valores no plasma seminal (por mL) e por seu nível total no ejaculado.

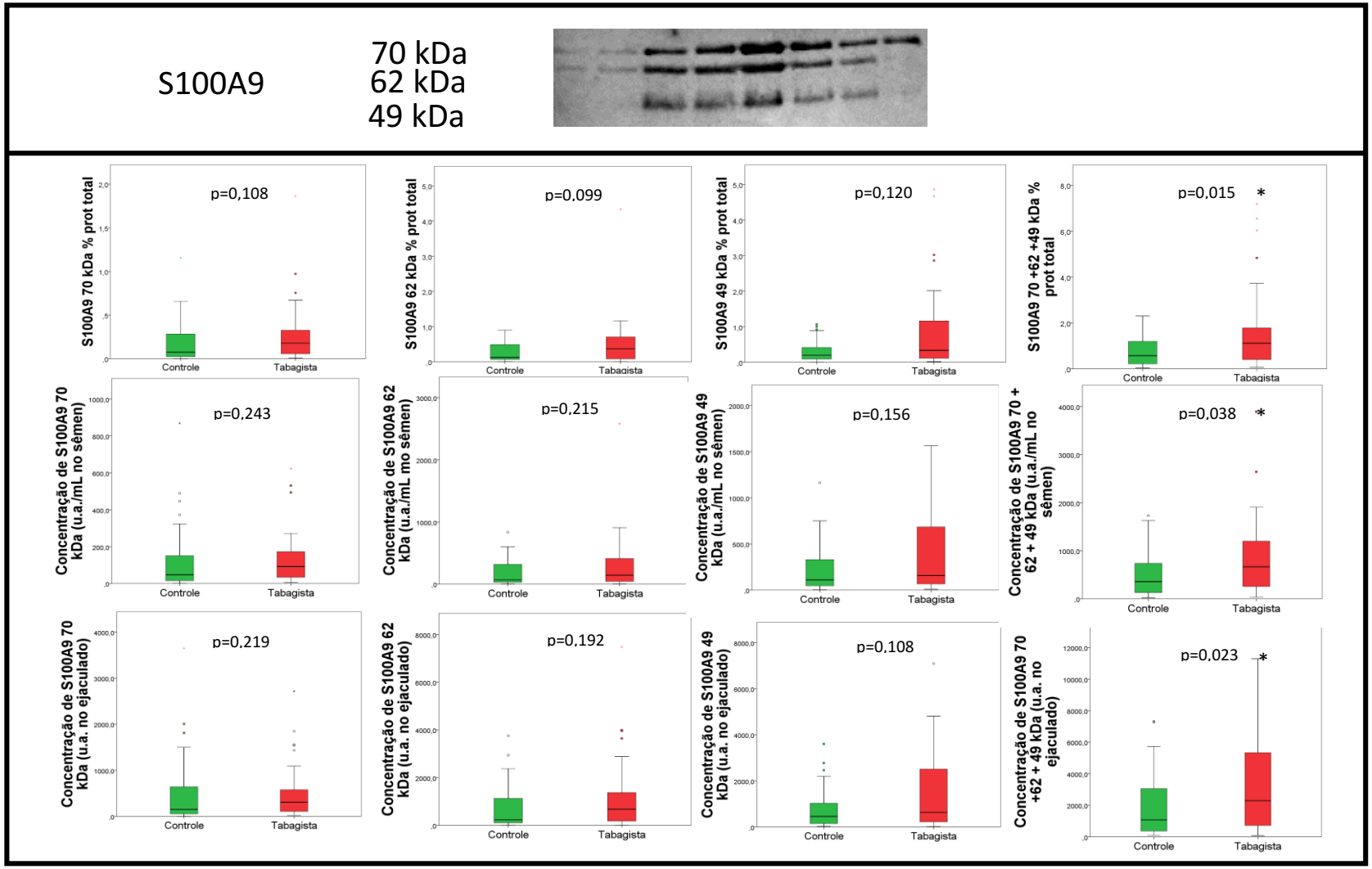

Figura 2. Análise dos níveis seminais da proteína S100A9 nos grupos controle e tabagista. Imagem dos resultados de *Western blotting*, analisados por quimioluminescência. *Box-plot* da porcentagem de proteína total, concentração no sêmen (valor por mL de sêmen) e do nível total no ejaculado (concentração multiplicada pelo volume ejaculado). u.a. – unidades arbitrárias; * - diferença estatisticamente significativa; °- *outlier* (p<0,05, teste de *Mann-Whitney*).

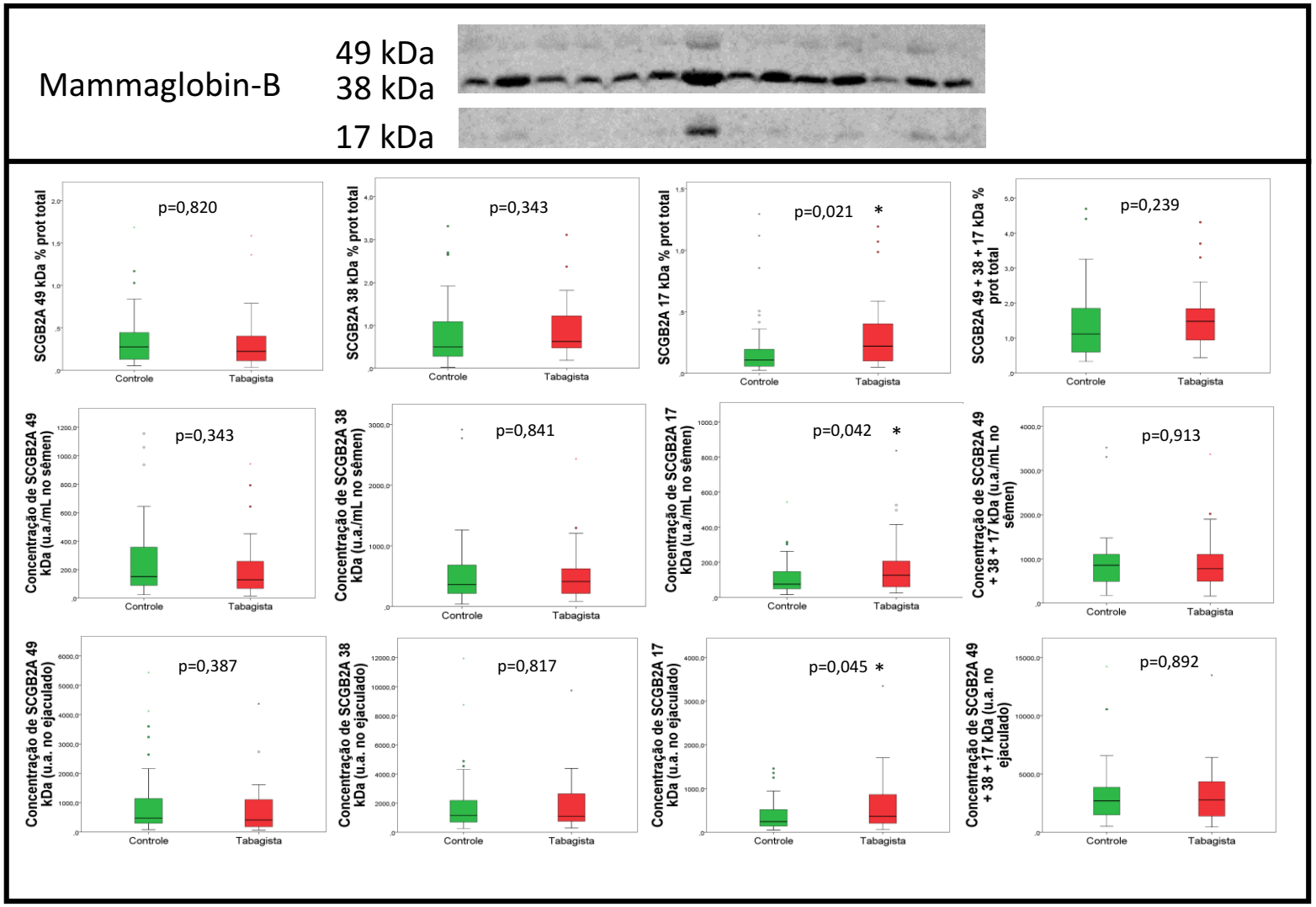

Figura 3. Análise dos níveis seminais da proteína SCGB2A1 nos grupos controle e tabagista. Imagem dos resultados de *Western blotting*, analisados por quimioluminescência. *Box-plot* da porcentagem de proteína total, concentração no sêmen (valor por mL de sêmen) e do nível total no ejaculado (concentração multiplicada pelo volume ejaculado). u.a. – unidades arbitrárias; * - diferença estatisticamente significativa; °- *outlier* (p<0,05, teste t de *Student*).

5 DISCUSSÃO

Levando-se em consideração as alterações seminais encontradas em pacientes tabagistas, o espermograma ainda é o principal teste realizado para iniciarmos a avaliação sobre alterações de fertilidade, e mais recentemente alguns testes que avaliam a função dos espermatozoides têm ganhado espaço (64,65). Este estudo procurou entender os mecanismos moleculares associados às alterações encontradas no sêmen de homens tabagistas.

Em estudo anterior (14), verificamos que homens tabagistas apresentam, no plasma seminal, composição proteica associada a mecanismos inflamatórios e à função imune, caracterizada principalmente pela proteína S100A9. Essa proteína pertence ao grupo das proteínas ligadoras de Ca^{2+} que possuem o domínio *EF-hand*, e estão expressas principalmente em macrófagos, mastócitos e neutrófilos (66). Esta proteína liga-se a receptores pró-inflamatórios como TLR4 e RAGE, essenciais na cascata de iniciação e amplificação da inflamação (67), além de estar presente em diversos tipos de tumores (68). A liberação de S100A9 pode exercer diversas funções, como a regulação da homeostase do cálcio envolvida na fosforilação de proteínas, rearranjo do citoesqueleto e migração celular. Ainda, é uma proteína quelante de zinco, podendo inibir a atividade de enzimas zinco-dependentes, como as metaloproteinases (69–71). A ligação desses metais, como o zinco e o cobre, na presença do cálcio, modula a mudança conformacional da S100A9, promovendo mudanças estruturais importantes, levando à formação de dímeros ou tetrâmeros (72), como os que acreditamos haver encontrado neste estudo. Concentrações insuficientes de cálcio aumentam a quantidade de S100A9 local, na tentativa de ocupar o maior número de receptores possíveis, quelando o maior número de metais disponíveis (73). Evidências indicam que este é o principal mecanismo de atuação da S100A9 na inibição do crescimento tumoral, juntamente com a apoptose (74).

Algumas modificações pós-traducionais já foram descritas para essa proteína, como a fosforilação e a S-nitrosilação, que podem alterar sua função (75). No primeiro caso, a fosforilação (adição de grupos fosfato a resíduos de serina, treonina ou tirosina) da proteína S100A9 resulta na inibição da polimerização da tubulina (76,77). Essa é uma importante modificação, visto que

a tubulina é o principal componente do citoesqueleto do flagelo dos espermatozoides (78), podendo levar a alterações no padrão de motilidade espermática. No segundo caso, Jia e colaboradores descreveram a proteína S100A9 como uma transnitrosilase (79), ou seja, uma proteína que sofre S-nitrosilação e também induz esse processo em outras proteínas. O processo descrito para essa proteína é extremamente inovador, uma vez que apenas dez proteínas com ação de S-nitrosilases foram identificadas até o momento (80). A S-nitrosilação é a modificação pós-traducional dependente de óxido nítrico (NO), o qual é covalentemente ligado ao grupo tiol livre das cisteínas, gerando o S-nitrosotiol (S-nitrosoproteínas). Esse é um dos principais mecanismos de ação biológica do NO, que participa em diversas vias de sinalização, como a diferenciação, o desenvolvimento e a morte celular (81). Sendo a S100A9 uma transnitrosilase, sua ação pode regular a função de outras proteínas, uma vez que este processo pode mediar uma ação tóxica ou protetora, dependendo do mecanismo de ação da proteína alvo (80).

A ligação da S100A9 aos receptores RAGE já foi demonstrada em cascatas de sinalização inflamatórias presentes em tumores de próstata, mama, pâncreas e pulmão (82). A ativação desse receptor tem sido considerada um evento chave no processo inflamatório e alguns estudos o utilizaram como um alvo terapêutico; seu bloqueio demonstrou melhorar o tratamento para diabetes, doenças neurodegenerativas e alguns tipos de câncer (83–85). Ainda, a ligação do complexo formado pela S100A9 com os receptores TLR4 pode resultar em um *feedback* positivo autócrino, levando a um *loop* das reações de amplificação de fatores inflamatórios, como citocinas e quimiocinas (67,86,87).

Alterações na expressão da proteína S100A9 já foram associados à NADPH oxidase. A hiperexpressão dessa proteína leva ao aumento da atividade da NADPH oxidase, aumentando a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) (HOCl, H_2O_2 e NO) (88). O aumento excessivo e não fisiológico das ERO está intimamente ligado com a fragmentação de DNA dos espermatozoides (89). Sendo assim, podemos sugerir que níveis aumentados dessa proteína no plasma seminal refletem o estado inflamatório testicular presente em homens tabagistas.

A outra proteína avaliada no presente estudo foi a SCGB2A1 (*mammaglobin-B, lipophilin-C, lacryoglobin*). Essa proteína foi inicialmente

descrita como uteroglobina por ter sido identificada em células uterinas de coelhos, e mais atualmente já foi encontrada na lágrima, tireóide, testículo, próstata e ovário (90). Mais tarde, com a descoberta de sua presença em outros tipos celulares e secreções, sua classificação foi unificada, passando a integrar o grupo das secretoglobinas (91,92). Diversos estudos demonstram que as secretoglobinas são proteínas multifuncionais, apresentando propriedades anti-inflamatórias/imunomodulatórias. Essa proteína parece inibir a atividade da fosfolipase A2 (93) e ainda atuar como sequestrante de moléculas como progesterona (94), retinoides (95), fosfolípedes, prostaglandinas (96) e até bifenilos policlorados (composto caracterizado como disruptor endócrino) (97). A Mammaglobin-B é o principal componente da prostateína, uma proteína secretória presente no fluido prostático de ratos (98). A expressão da prostateína tem a função de ligação a esteroides, mantendo um nível relativamente alto de andrógenos no ambiente prostático (99). Ela também possui ação antioxidante e imunosupressiva (100), protegendo o espermatozoide no trato reprodutor feminino (101). Análises por espectrometria de massas identificaram proteínas análogas a prostateína em humanos (90,102), corroborando a presença dessa proteína no plasma seminal. Todas essas atividades são reguladas essencialmente por hormônios esteroides e, apesar dessa proteína não possui uma função fisiológica clara, alguns estudos já identificaram polimorfismos em genes associados a doenças inflamatórias e autoimunes (103–105).

A Mammaglobin-B possui uma massa de aproximadamente 17 kDa e pode ser encontrada em forma de dímeros, pois pode se agrupar com a SCGB1D1 (92,106). Em nosso trabalho, pudemos encontrar a presença da proteína tanto com a massa esperada como em uma massa de 38 kDa, sugestiva de ser a forma dimerizada de aproximadamente 34 kDa. Em um estudo anterior essa proteína foi encontrada exclusivamente no grupo controle, por meio da técnica de espectrometria de massas (14), fato em desacordo com os resultados confirmatórios obtidos no presente estudo, em que verificamos maiores níveis no grupo tabagista.

Análises proteômicas *label-free* são técnicas que buscam visualizar a composição de proteínas em uma dada amostra de interesse, de uma maneira abrangente. Esse tipo de análise envolve diversas etapas, incluindo a homogeneização e extração de proteínas, desnaturação, digestão e a

espectrometria de massas em si (107). Geralmente, esse tipo de ferramenta gera um volume de dados difícil de serem separados de ruído artefatual da técnica sem o uso de programas específicos (108). Sendo assim, para que essa grande quantidade de dados gere informações relevantes, há a necessidade de padronizarmos as análises dos dados, de acordo com as normas *Human Proteome Organization* (HUPO) (109). Ainda assim, os resultados gerados costumam apresentar coeficientes de variação altos, em torno de 33%, mesmo utilizando equipamentos considerados estáveis, como o utilizado em nosso estudo de proteômica (110). Portanto, resultados de experimentos de proteômica nem sempre são corroborados por técnicas confirmatórias, como o *Western blotting*.

Sendo assim, níveis aumentados dessa proteína no plasma seminal de homens tabagistas podem refletir a tentativa do trato reprodutor masculino em controlar alterações ligadas a concentração de hormônios locais, bem como de eliminação de agentes estressores.

6 CONCLUSÃO

O tabagismo está associado a uma elevação dos níveis seminais de S100A9 e Mammaglobin-B, o que indica a presença de atividade inflamatória seminal.

ESTUDO 2

Expressão de mediadores inflamatórios no plasma seminal de homens tabagistas

1 INTRODUÇÃO

As interleucinas-1 (IL-1) e IL-1β são citocinas pró-inflamatórias, que ativam a resposta imunológica e a inflamação (111). Ainda, induzem a produção de espécies reativas ao oxigênio, levando à peroxidação lipídica e à fragmentação de DNA dos espermatozoides (20). Semelhante às IL-1 e IL-1β, IL-18 é responsável pela indução de células T e *natural killer*, essenciais para a resposta a infecções (112,113). Níveis aumentados de interleucina-18 (IL-18) podem refletir danos ao sêmen, e consequentemente infertilidade (114).

As IL-1β e IL-18 são produzidas a partir do complexo inflamassomo (Figura 4). Inflamassomos são complexos macromoleculares aptos a servirem como plataformas para ativação de citocinas inflamatórias. Esse complexo é formado por um receptor citosólico do tipo NLR, por um domínio recrutador de caspase (ASC) e pela pró-caspase-1 (forma inativa) (115). Esse complexo pode ser ativado por uma série de fatores (116,117), principalmente pelo efluxo de potássio para o meio extracelular, ativando assim os receptores panexina-1 e P2X7. Ao ativar o complexo inflamassomo são produzidas caspase-1, IL-1β e IL-18, que são liberadas para o meio extracelular após sua produção. Essa liberação de citocinas pode resultar na piroptose, a morte celular não homeostática, regulada pela lise celular, e considerado um mecanismo de defesa chave contra patógenos (118).

Em um estudo recente foi demonstrado que o complexo inflammasomo é responsável pela baixa motilidade dos espermatozoides presente em pacientes com lesão medular (119). Isso foi verificado quando a proteína ASC foi bloqueada *in vitro*, e a motilidade dos espermatozoides aumentou. Além disso, níveis aumentados das proteínas do inflamassomo, ASC (domínio do recrutamento de caspase), caspase-1, de IL-1β e IL-18 estão presentes no plasma seminal de homens com lesão medular, quando comparados a pacientes controle (119).

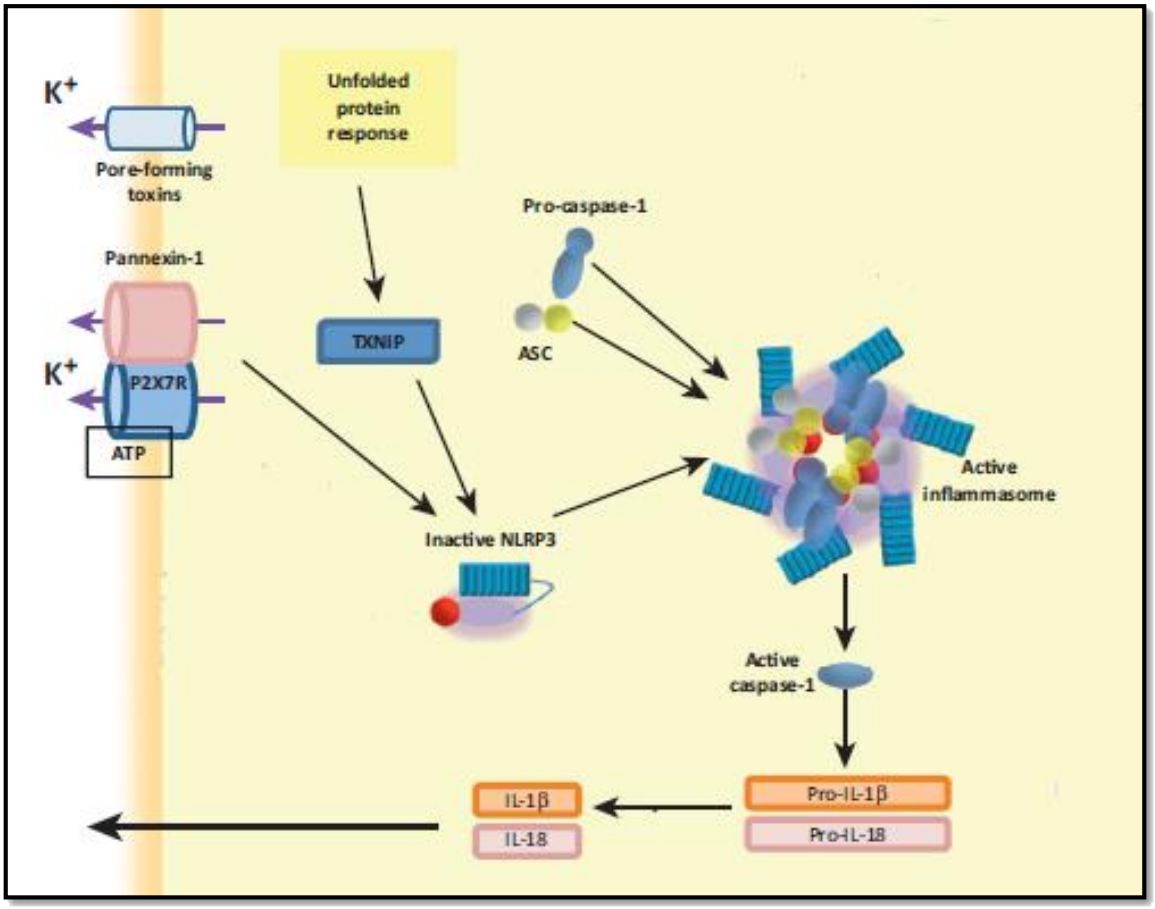

Figura 4. Complexo inflamassomo. *Monie*, 2013 (120).

Estudos anteriores de nosso grupo demonstraram que o plasma seminal de homens tabagistas apresenta aspectos inflamatórios importantes (22,52). Esse perfil inflamatório seminal – ainda não completamente elucidado em homens tabagistas – pode explicar as alterações funcionais dos espermatozoides observadas nesses pacientes (9,22). Como o complexo do inflamassomo participa do perfil inflamatório seminal, hipotetizamos que seria uma via por meio da qual o tabagismo poderia levar a alterações seminais.

2 OBJETIVO

Investigar se os níveis de citocinas inflamatórias e dos componentes do inflamassomo estão alterados no plasma seminal de homens tabagistas.

3 MÉTODO

3.1 Pacientes

Este estudo foi desenvolvido entre julho de 2017 e janeiro de 2018 no *The Miami Project to Cure Paralysis, Miller School of Medicine,* da *University of Miami,* sob orientação da Dra. Nancy Brackett e foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa dessa Universidade (CAAE: 43590015.7.0000.5505). Todos os homens incluídos neste estudo assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido. Este estudo foi financiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Programa de Doutorado Sanduiche no Exterior (CAPES-PDSE) por meio de bolsa de estágio em pesquisa no exterior (processo 88881.132658/2016-01).

Um estudo transversal foi realizado incluindo homens com idade entre 20 e 50 anos que procuram o Setor de Reprodução Humana da Disciplina de Urologia, Departamento de Cirurgia, da UNIFESP para investigação de infertilidade conjugal ou como voluntários de pesquisa. Foram incluídos 37 homens controles e 41 tabagistas exclusivamente de cigarros.

Durante a avaliação clínica dos pacientes ou voluntários, realizada por médicos do setor, um questionário foi preenchido para cada indivíduo, incluindo dados sobre estilo de vida, índice de massa corpórea (IMC), presença ou ausência de varicocele e histórico médico. A varicocele foi diagnosticada por exame físico, incluindo palpação escrotal em sala com temperatura (>23 °C) e iluminação adequadas, com o homem em posição ortostática. Na presença de varicocele, esta foi classificada de acordo com Dubin e Amelar (59) em: grau I (dilatação do cordão espermático palpável apenas com a manobra de Valsalva), grau II (dilatação do cordão espermático facilmente palpável, demonstrando-se acentuado enchimento venoso durante a manobra de Valsalva) ou grau III (dilatação volumosa do cordão espermático facilmente visualizada e ectasia intensificada durante manobra de Valsalva). Com base nesse questionário, foram selecionados os indivíduos incluídos neste estudo, os quais coletaram as amostras seminais por masturbação, com dois a cinco dias de abstinência ejaculatória e em recipientes de polipropileno estéreis (60).

Para o grupo controle, foram selecionados homens com volume ejaculado ≥ 1,5 mL, concentração de espermatozoides ≥ $15x10^6$/mL de sêmen, motilidade

progressiva ≥ 32%, morfologia estrita ≥ 4% e concentração de leucócitos inferior a $1x10^6$/mL de sêmen. Para o grupo tabagismo, foram incluídos apenas indivíduos que usavam pelo menos 10 cigarros por dia. Os fatores de exclusão para ambos os grupos foram: obesidade, varicocele, histórico de febre num período de noventa dias anterior à coleta do sêmen, evidências de infecção urogenital, uso de drogas de abuso e histórico de câncer e cirurgias no trato urogenital ou endocrinopatias.

3.2 Desenho experimental

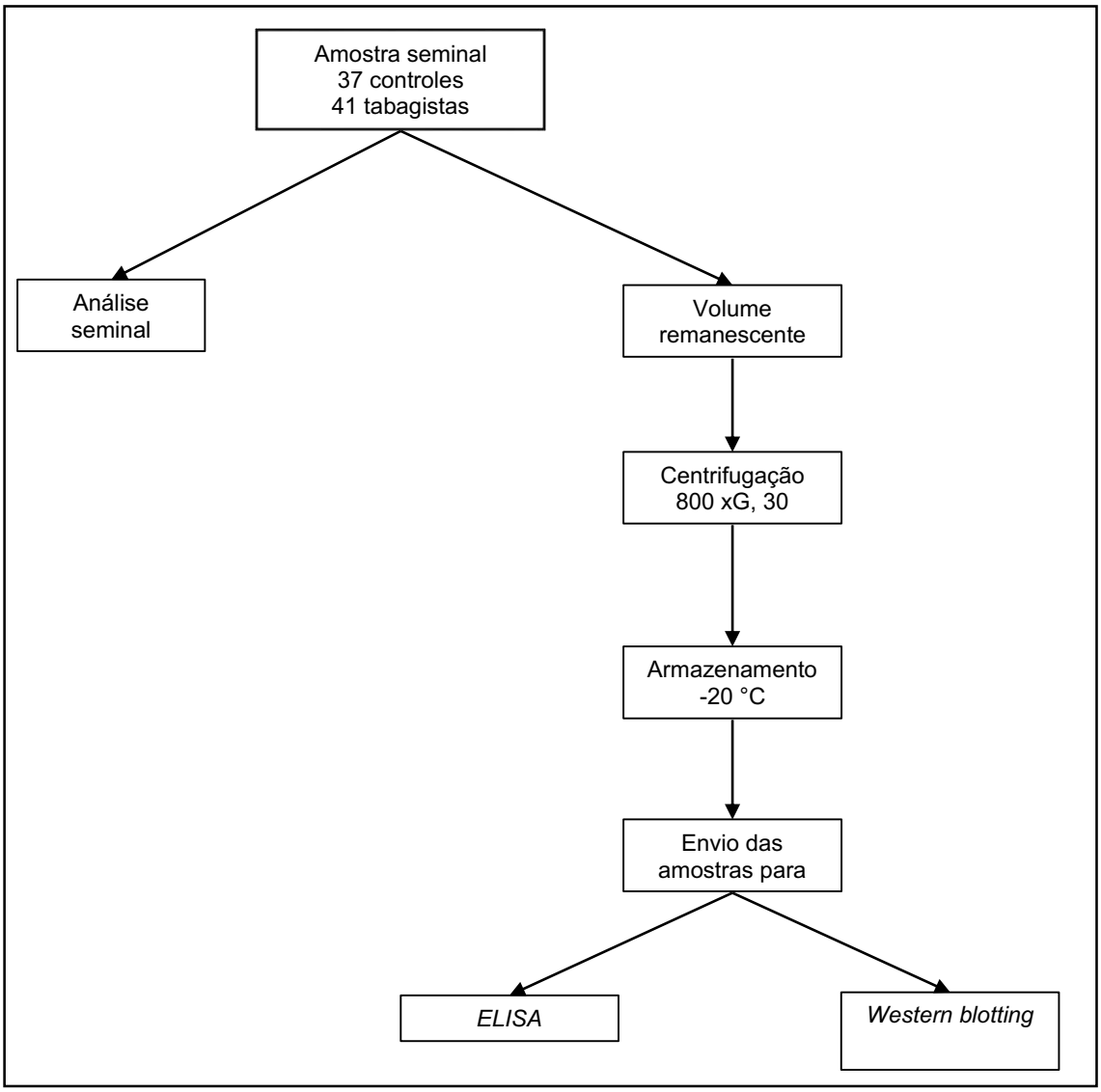

Figura 5. Desenho experimental do estudo 2. Expressão de mediadores inflamatórios no plasma seminal de homens tabagistas

Após a liquefação, uma alíquota do sêmen foi submetida ao espermograma convencional, realizada no Laboratório de Andrologia da UNIFESP, de acordo com as recomendações da Organização Mundial da Saúde de 2010 (1). O volume restante das amostras foi imediatamente encaminhado ao Centro de Pesquisa em Urologia da UNIFESP. A amostra foi centrifugada a 800 x*G* por 30 minutos e o plasma seminal sobrenadante foi congelado sem adição de crioprotetores e mantido a -20 °C até o momento da quantificação das proteinas e da análise das citocinas. As amostras foram enviadas para a Universidade de Miami, onde foi realizada as análises por *Western blotting* e ELISA. No momento das análises, as amostras foram centrifugadas a 16.000 xG por uma hora a 4 ºC para remover o restante dos debris celulares.

3.3 Análise por *Western blotting*

Para análise das proteínas do inflamassomo, foi utilizada a técnica de *Western blotting*. Inicialmente, foi realizada a quantificação de proteínas totais do plasma seminal de cada amostra, utilizando o método de Ensaio de Proteína BCA (Ácido Bicinconínico - Método de Lowry modificado), descrito no estudo 1 (61).

Para a análise por *Western blotting*, todos os reagentes e softwares utilizados foram da *Bio-rad (Laboratories California,EUA.),* a não ser quando descrito. Um volume de plasma seminal correspondente a 50 µg de proteínas de cada indivíduo foi homogeneizado com água para a obtenção de um volume final de 7,5 µL, que foi diluído em igual volume (7,5 µL) de tampão de amostra 2x *Laemmli sample buffer* (65,8 mM Tris-HCl pH 6,8; 26,3% (w/v) glicerol; 2,1% Dodecil Sulfato de Sódio (SDS); 0,01% azul de bromofenol; 355 mM 2-mercaptoetanol). Em seguida, as amostras foram aquecidas a 100 °C por cinco minutos e adicionadas a um gel de *SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis* (PAGE) *Mini-PROTEAN TGX Stain-free*, com concentração gradiente de poliacrilamida de 4-20%. Como marcador de peso molecular, foi utilizada uma mistura 1:1 *do Precision Plus Protein unstained* e *Precision Plus Protein All Blue*.

A separação das proteínas foi realizada por meio de eletroforese a 300 V e 400 mA por trinta e cinco minutos, em sistema de eletroforese digital (*Mini-Protean Vertical Electrophoresis Cell*). Após a eletroforese, os géis foram equilibrados em solução de transferência por 15 minutos. Após esse período, os géis foram ativados no analisador de uv/quimioluminescência (ChemiDoc Touch) por 45 segundos. Em seguida, as proteínas foram transferidas dos géis para membranas de nitrocelulose (0,2 µm) em sistema úmido (mini *Trans-Blot Cell*) por uma hora a 4 ºC, utilizando-se corrente de 400mA e tensão de 100 V. Então, as membranas foram novamente colocadas no analisador para a obtenção das imagens referentes à quantidade total de proteínas (*stain-free*) por 45 segundos. Então, as membranas foram lavadas com *Phosphate Saline Tween 20* (TPBS,137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 10 mM Na_2HPO_4; 1,8 mM KH_2PO_4) por 5 minutos e bloqueadas com solução de bloqueio (3% BSA em TPBS), sob agitação, por uma hora a temperatura ambiente.

Em seguida, as amostras foram incubadas por duas horas, em temperatura ambiente, com os anticorpos primários específicos para as proteínas estudadas, diluídos em solução de bloqueio, lavadas por três vezes de dez minutos cada com TPBS. Em seguida, foram incubadas com o anticorpo secundário conjugado à enzima peroxidase, diluído em solução de bloqueio, por uma hora em temperatura ambiente, seguido de três lavagens de dez minutos cada, com TPBS. Todas as etapas foram realizadas sob agitação constante. Para cada anticorpo foram padronizadas as seguintes concentrações:

- ASC (AB3607, Millipore): solução de bloqueio com BSA 3% em TPBS; anticorpo primário na concentração 1:1000 (v:v); anticorpo secundário anti-IgG de coelho, na concentração 1:20000 (v:v) (12348, Millipore).
- Pannexin 1 (ab124131, Abcam): solução de bloqueio com BSA 3% em TPBS; anticorpo primário na concentração 1µg/mL; anticorpo secundário anti-IgG de coelho, na concentração 1:20000 (v:v) (12348, Millipore).
- NLRP3 (ab98151, Abcam): solução de bloqueio com BSA 3% em TPBS; anticorpo primário na concentração 1:3000 (v:v); anticorpo secundário anti-IgG de coelho, na concentração 1:20000 (v:v) (12348, Millipore).

- P2X7R (ab48871, Abcam): solução de bloqueio com BSA 3% em TPBS; anticorpo primário na concentração 1,25µg/mL; anticorpo secundário anti-IgG de coelho, na concentração 1:20000 (v:v) (12348, Millipore).

Para a detecção por quimioluminescência, foi utilizado o reagente *Enhanced chemiluminescence* (*ECL Prime™ Western blotting Detection Reagents*, GE *Healthcare*), para a posterior revelação por meio do analisador de quimioluminescência *ImageQuant LAS4000* (GE *Healthcare*). Para a análise das bandas, foi utilizado o *software ImageQuant* TL 7.0 (GE *Healthcare Life Sciences*, Reino Unido). Quando a proteína apresentou mais de uma banda no *Western blotting*, essas foram analisadas separadamente e tanto os valores individuais de cada banda quanto a soma de todas as bandas foram utilizados para a análise estatística.

Para a incubação de outro anticorpo na mesma membrana, o anticorpo anterior foi removido das membranas, por meio da adição de solução de *stripping* (*Restore™ PLUS Western Blot Stripping Buffer*, por trinta minutos em temperatura ambiente sob agitação constante), seguido de lavagem com PBS-T (1x10 minutos). Então, as membranas foram novamente bloqueadas, incubadas com o anticorpo de interesse, reveladas e analisadas, como descrito anteriormente. Para avaliar se a remoção dos anticorpos foi eficiente, uma membrana foi bloqueada, incubada apenas com o anticorpo secundário e revelada por quimioluminescência.

Para normalização dos dados, foi utilizado o total de proteínas de cada amostra, a fim de se obter um aspecto quantitativo do *Western blotting*, devido a variações experimentais e biológicas (62,63). Para isso, as membranas foram coradas com Ponceau S *solution* (Sigma-Aldrich) por um minuto em agitação e lavadas com água milli-Q até a remoção da coloração de fundo. Então, as membranas foram digitalizadas no ImageQuant LAS4000 (GE *Healthcare*) e analisadas no *software* ImageQuant TL 7.0 (GE *Healthcare*). A densidade total de cada amostra foi utilizada para a normalização. Assim, para que tanto variações intra- quanto inter-membranas fossem corrigidas, foi calculado um fator de correção (FC) do total de proteínas para cada membrana (cálculo

descrito abaixo). Então, o valor do total de proteínas de cada amostra foi dividido pelo FC da sua membrana.

$$FCmembrana = \frac{média\ do\ total\ de\ proteínas\ em\ todas\ as\ amostras\ da\ membrana}{média\ do\ total\ de\ proteínas\ em\ todas\ as\ membranas}$$

$$Total\ de\ proteínas\ corrigido = \frac{total\ de\ proteínas\ da\ amostra}{FCmembrana}$$

3.4 Ensaio ELISA

Os níveis de Caspase-1, IL-1β e IL-18 foram mensurados no plasma seminal pelo método de ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*) (119), e os passos foram seguidos como descrito pelo fabricante (R&D Systems – Códigos: DCA100, DBP180 e DLB50). Todos os reagentes e anticorpos utilizados nestes experimentos estavam contidos no kit do fabricante (R&D Systems). Desta forma, primeiramente, foi adicionado 100 µL de plasma seminal e da curva padrão na microplaca de 96 poços. A concentração da curva padrão contendo concentrações conhecidas do antígeno, em duplicata, foi adicionada a cada placa, assim como um controle negativo, contendo apenas o diluente do kit. Para a citocina IL-1β foi utilizada uma curva padrão entre 0 pg/mL e 125 pg/mL. Para a citocina IL-18 foi utilizada uma curva padrão entre 0 pg/mL e 1000 pg/mL. Para a citocina Caspase-1, foi utilizada uma curva padrão entre 0 pg/mL e 400 pg/mL.

Então, a placa foi incubada por uma hora e meia, em temperatura ambiente, no escuro e, após esse procedimento, os poços foram lavados três vezes com 400 µL de tampão de lavagem para a retirada do tampão de revestimento. Em seguida, a placa foi incubada por duas horas, em temperatura ambiente, no escuro, com os anticorpos específicos para cada interleucina de interesse. Após incubação, a solução foi retirada e os poços foram lavados três vezes com tampão de lavagem. Em seguida, foram adicionados 200 µL do anticorpo secundário conjugado a peroxidase, por trinta minutos, em temperatura ambiente e no escuro. Após a incubação, a solução foi retirada e os poços foram lavados três vezes com tampão de lavagem. Por fim, 200 µL de solução contendo peróxido de hidrogênio e tetrametilbenzidina foram adicionados em cada poço, como substrato para a peroxidase. A reação ocorreu por trinta minutos, seguido da adição de 50 µL de solução 2N de ácido sulfúrico para cessar a reação. Para todas as citocinas, a quantificação foi realizada por espectrofotometria em leitor de microplaca em um comprimento de onda de 450 nm (Omega, BMG Labtech). A concentração dos níveis de citocinas foi determinado em pg/mL a partir de uma curva padrão, criada para cada interleucina.

3.5 Análise estatística

Para a análise estatística, foi utilizado o *software* PAWS (SPSS) 18.0. Primeiramente, foi realizada a análise estatística descritiva dos dados seminais de cada amostra. Para a comparação destas variáveis entre os grupos, primeiramente, foi avaliada a normalidade da distribuição dos dados pelo teste de *Kolmogorov-Smirnov*. Os grupos foram comparados pelo teste de *Mann-Whitney*.

Para a análise dos níveis seminais das proteínas, o total corrigido das proteínas do complexo inflamassomo (ASC, Pannexin 1, NLRP3 e P2X7R) foi multiplicado pelo volume seminal de cada amostra, a fim de obter a concentração das proteínas no plasma seminal (u.a./mL) quanto o nível total de proteínas no ejaculado (u.a. no ejaculado). Os valores corrigidos de cada proteína foram transformados pela raiz quadrada, pois possuíam valores resultantes muito pequenos (entre 0 e 1). A normalidade da distribuição dos dados de cada proteína foi avaliada, utilizando-se o teste de *Kolmogorov-Smirnov*. A proteína Pannexin 1 (bandas de massa 25 kDa e 80 kDa) foi comparada pelo teste de *Mann-Whitney* e as demais proteínas, pelo teste t de *Student*. Para todos os casos, um alfa de 5% foi adotado.

Para a análise dos níveis seminais de citocinas, os valores obtidos foram multiplicados pelo volume seminal de cada amostra, a fim de obter a concentração das citocinas no plasma seminal (pg/mL) quanto o nível total de citocinas no ejaculado (pg no ejaculado). Os valores de IL-18 foram transformados pela raiz quadrada, pois possuíam valores resultantes de menores ordens de grandeza. Os valores de Caspase-1 e IL-1β foram transformados aos seus valores logarítmicos, pois possuíam valores resultantes de maiores ordens de grandeza (acima de 10). Os grupos foram comparados pelo teste t de *Student.* Para todos os casos, um alfa de 5% foi adotado.

4 RESULTADOS

Os dados das características individuais e clínicas dos indivíduos recrutados para esse estudo estão apresentados na Tabela 2. Os homens não apresentaram diferenças quanto a idade, volume, motilidade, concentração de neutrófilos e células redondas. Os tabagistas apresentaram menor concentração (p=0,009), contagem total (p=0,004) e morfologia (p=0,018) dos espermatozoides quando comparado ao grupo controle.

Para os dados de *Western blotting,* a proteína ASC apresentou duas bandas diferentes, uma com 50 kDa e outra com 20 kDa (massa esperada). O grupo tabagista apresentou uma menor concentração de ASC 20kDa no plasma seminal (p=0,037) quando comparado ao grupo controle (Figura 6). Não foram observadas diferenças nos níveis totais, concentração no plasma seminal e no ejaculado.

A proteína Pannexin-1 apresentou duas bandas diferentes, uma com 80 kDa e outra com 25 kDa. Não foram encontradas diferenças dessa proteína nos níveis totais, concentração no plasma seminal e no ejaculado (Figura 7). A proteína NLRP3 apresentou uma banda de 118 kDa (massa esperada). Não foram encontradas diferenças dessa proteína nos níveis totais, concentração no plasma seminal e no ejaculado (Figura 8). A proteína P2X7 apresentou uma banda de 31 kDa (massa esperada). Não foram encontradas diferenças dessa proteína nos níveis totais (p=0,683), concentração no plasma seminal e no ejaculado (Figura 9).

Para os dados de *ELISA,* não foram encontradas diferenças na concentração no plasma seminal e no ejaculado para a Caspase-1 (Figura 10). Para a IL-18, a concentração no plasma seminal e no ejaculado apresentou-se aumentada quando comparada ao grupo controle (p=0,005, 0,019) (Figura 11). Para a IL-1β, não foram encontradas diferenças na concentração no plasma seminal e no ejaculado (Figura 12).

Tabela 4: Idade e qualidade seminal de tabagistas e controles incluídos no estudo.

	Controle (n=37)	Tabagista (n=41)	p
Idade (anos)			
Mediana;IQ	33,0; 7,0	33,0; 6,0	0,362
Q1-Q3	31,0-37,5	30,7-36,5	
Volume ejaculado (mL)			
Mediana;IQ	3,7; 1,3	3,6; 1,8	0,730
Q1-Q3	3,2-4,5	2,5-4,4	
Concentração de espermatozoides (milhões/mL)			
Mediana;IQ	65,3; 51,7	39,5; 49,8	**0,009***
Q1-Q3	37,9-87	25,3-80,5	
Contagem total de espermatozoides (milhões)			
Mediana;IQ	205,2; 243,7	164,7;153,6	**0,004***
Q1-Q3	149,7-335,3	86,6-246,6	
Motilidade progressiva dos espermatozoides (%)			
Mediana;IQ	57,0; 14,0	54,0; 15,0	0,613
Q1-Q3	46,0-58,0	39,7-56,5	
Motilidade não progressiva dos espermatozoides (%)			
Mediana;IQ	5,0; 3,0	4,0; 3,0	0,395
Q1-Q3	4,0-7,0	4,0-6,0	
Imotilidade dos espermatozoides (%)			
Mediana;IQ	37,0; 12,0	42,0; 12,0	0,473
Q1-Q3	36,0-50,0	38,2-57,5	
Morfologia dos espermatozoides (% normais)			
Mediana;IQ	6,0; 3,0	5,0; 4,0	**0,018***
Q1-Q3	4,0-8,0	3,0-6,5	
Células redondas (milhões/mL)			
Mediana;IQ	1,0; 1,4	1,1; 1,3	0,685
Q1-Q3	0,4-1,8	0,7-2,7	
Neutrófilos (milhões/mL)			
Mediana;IQ	0,1; 0,2	0,2; 0,5	0,279
Q1-Q3	0,0-0,1	0,0-0,2	

* Diferença significativa ($p<0,05$).
IQ: intervalo interquartil
Q1: quartil 1
Q3: quartil 3

Tabela 5: Análise dos níveis seminais da proteína ASC nos grupos controle e tabagista. Grupos foram comparados pelo teste de t de *Student*.

	Controle (n=37)	Tabagista (n=41)	p
ASC 50 kDa % prot total			
Média; DP	$2,8 \times 10^{-3}$; $2,6 \times 10^{-3}$	$3,5 \times 10^{-3}$; $2,5 \times 10^{-3}$	0,197
ASC 20 kDa % prot total			
Média; DP	$6,2 \times 10^{-3}$; $9,1 \times 10^{-3}$	$4,4 \times 10^{-3}$; $4,2 \times 10^{-3}$	0,505
ASC 50+20 kDa % prot total			
Média; DP	$1,0 \times 10^{-2}$; $1,0 \times 10^{-2}$	$0,8 \times 10^{-2}$; $0,5 \times 10^{-2}$	0,783
ASC 50 kDa (u.a./mL no sêmen)			
Média; DP	2,3; 2,4	2,4; 2,2	0,831
ASC 20 kDa (u.a./mL no sêmen)			
Média; DP	5,2; 7,6	2,2; 2,1	**0,037**
ASC 50+20 kDa (u.a./mL no sêmen)			
Média; DP	7,8; 9,1	4,9; 3,3	0,502
ASC 50 kDa (u.a./mL no ejaculado)			
Média; DP	9,1; 10,1	8,4; 7,9	0,880
ASC 20 kDa (u.a./mL no ejaculado)			
Média; DP	20,2; 28,4	9,2; 9,4	0,054
ASC 50+20 kDa (u.a./mL no ejaculado)			
Média; DP	30,2; 35,9	18,6; 14,5	0,442

* Diferença significativa ($p<0,05$).
DP: desvio padrão
u.a.: unidades arbitrárias

Tabela 6: Análise dos níveis seminais da proteína Pannexin-1 nos grupos controle e tabagista. Grupos foram comparados pelo teste de *Mann-Whitney*.

	Controle (n=37)	Tabagista (n=41)	p
Pannexin-1 80 kDa % prot total			
Mediana; IQ	$3,3 \times 10^{-4}$; $9,2 \times 10^{-4}$	$2,8 \times 10^{-4}$; $14,6 \times 10^{-4}$	0,851
Pannexin-1 25 kDa % prot total			
Mediana; IQ	$11,6 \times 10^{-4}$; $28,7 \times 10^{-4}$	$18,6 \times 10^{-4}$; $75,5 \times 10^{-4}$	0,686
Pannexin-1 80+25 kDa % prot total			
Mediana; IQ	$5,9 \times 10^{-2}$; $5,0 \times 10^{-2}$	$6,8 \times 10^{-2}$; $8,0 \times 10^{-2}$	0,253
Pannexin-1 80 kDa (u.a./mL no sêmen)			
Mediana; IQ	0,3; 0,6	0,2; 0,7	0,643
Pannexin-1 25 kDa (u.a./mL no sêmen)			
Mediana; IQ	1,1; 2,9	0,6; 3,1	0,829
Pannexin-1 80+25 kDa (u.a./mL no sêmen)			
Mediana; IQ	2,0; 2,5	1,7; 4,5	0,778
Pannexin-1 80 kDa (u.a./mL no ejaculado)			
Mediana; IQ	1,4; 2,8	1,1; 3,1	0,953
Pannexin-1 25 kDa (u.a./mL no ejaculado)			
Mediana; IQ	4,1; 10,5	2,2; 13,9	0,975
Pannexin-1 80+25 kDa (u.a./mL no ejaculado)			
Mediana; IQ	7,6; 7,7	6,6; 23,5	0,952

* Diferença significativa ($p<0,05$).
IQ: intervalo uinterquartil
u.a.: unidades arbitrárias

Tabela 7: Análise dos níveis seminais das proteínas NLRP3 e P2X7R nos grupos controle e tabagista. Grupos foram comparados pelo teste t de *Student*.

	Controle (n=37)	Tabagista (n=41)	p
NLRP3 118 kDa % prot total			
Média;DP	$1,4 \times 10^{-3}$; $0,9 \times 10^{-3}$	$1,7 \times 10^{-3}$; $1,3 \times 10^{-3}$	0,201
NLRP3 118 kDa (u.a./mL no sêmen)			
Média;DP	0,9; 0,4	1,2; 1,1	0,537
NLRP3 118 kDa (u.a./mL no ejaculado)			
Média;DP	4,1; 2,5	3,8; 2,6	0,841
P2X7R 31 kDa % prot total			
Média;DP	$4,2 \times 10^{-3}$; $2,6 \times 10^{-3}$	$5,3 \times 10^{-3}$; $5,1 \times 10^{-3}$	0,683
P2X7R 31 kDa (u.a./mL no sêmen)			
Média;DP	2,8; 1,8	2,7; 2,2	0,611
P2X7R 31 kDa (u.a./mL no ejaculado)			
Média;DP	11,4; 7,8	11,2; 10,9	0,600

* Diferença significativa ($p<0,05$).
DP: desvio padrão
u.a.: unidades arbitrárias

Tabela 8: Análise dos níveis seminais da caspase-1, interleucina 18 e interleucina 1 β nos grupos controle e tabagista. Grupos foram comparados pelo teste t de *Student*.

	Controle (n=37)	Tabagista (n=41)	p
Caspase-1 (pg/mL no sêmen)			
Média;DP	40,7; 34,0	51,1; 41,2	0,207
Caspase-1 (pg/mL no ejaculado)			
Média;DP	149,7; 140,7	172,5; 93,7	0,139
IL-18 (pg/mL no sêmen)			
Média;DP	36,3; 46,1	55,0; 35,4	**0,005**
IL-18 (pg/mL no ejaculado)			
Média;DP	154,4; 206,7	204,7; 143,7	**0,010**
IL-1β (pg/mL no sêmen)			
Média;DP	72,6; 51,4	77,8; 95,7	0,319
IL-1β (pg/mL no ejaculado)			
Média;DP	297,7; 239,2	316,5; 498,4	0,355

* Diferença significativa ($p<0,05$).
DP: desvio padrão
u.a.: unidades arbitrárias

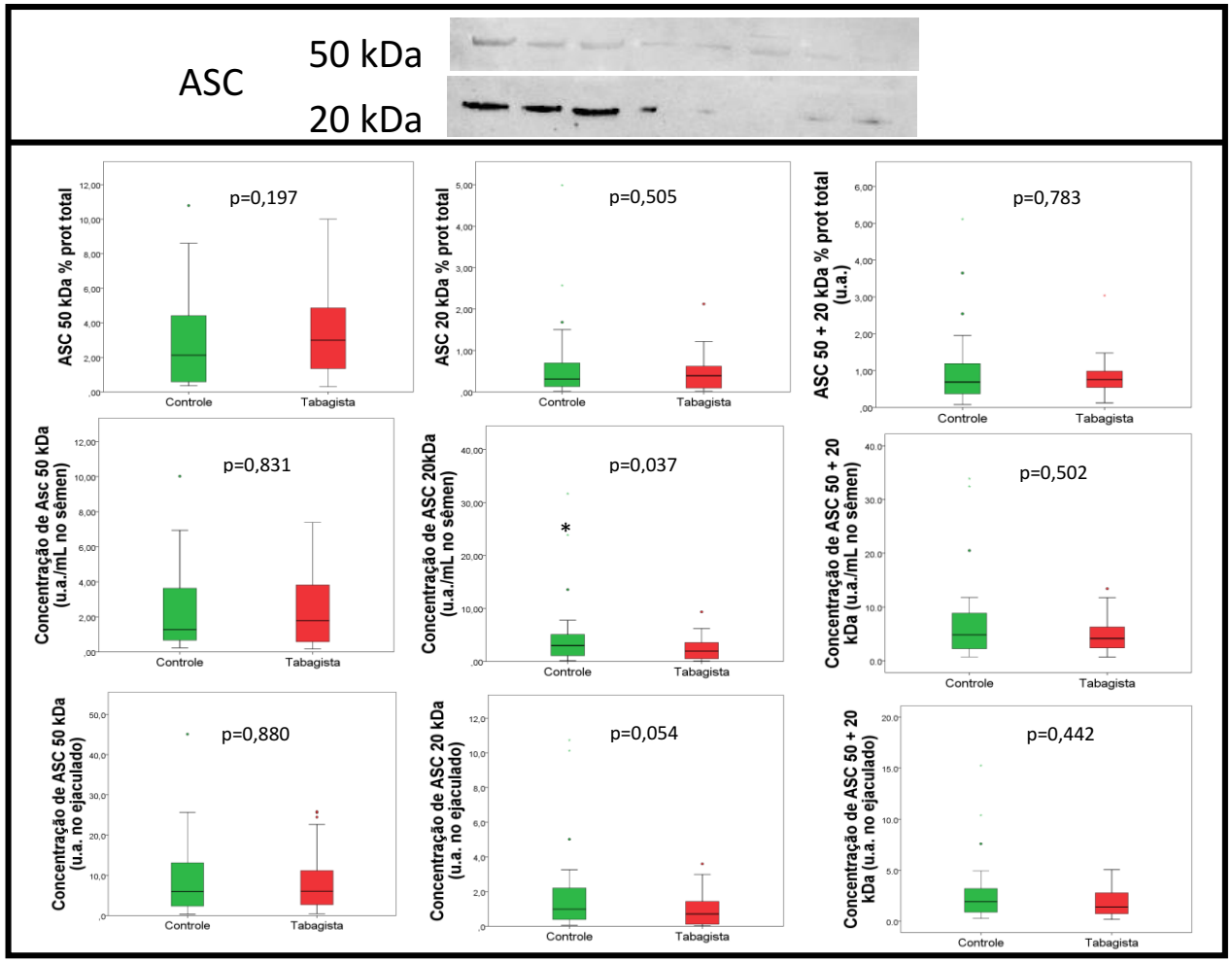

Figura 6. Análise dos níveis seminais da proteína ASC nos grupos controle e tabagista. Imagem dos resultados de *Western blotting*, analisados por quimioluminescência. Box-plot da porcentagem de proteína total, concentração no sêmen (valor por mL de sêmen) e do nível total no ejaculado (concentração multiplicada pelo volume ejaculado). u.a. – unidades arbitrárias; * - diferença estatisticamente significativa; °- *outlier* (p<0,05, teste de t de *Student*).

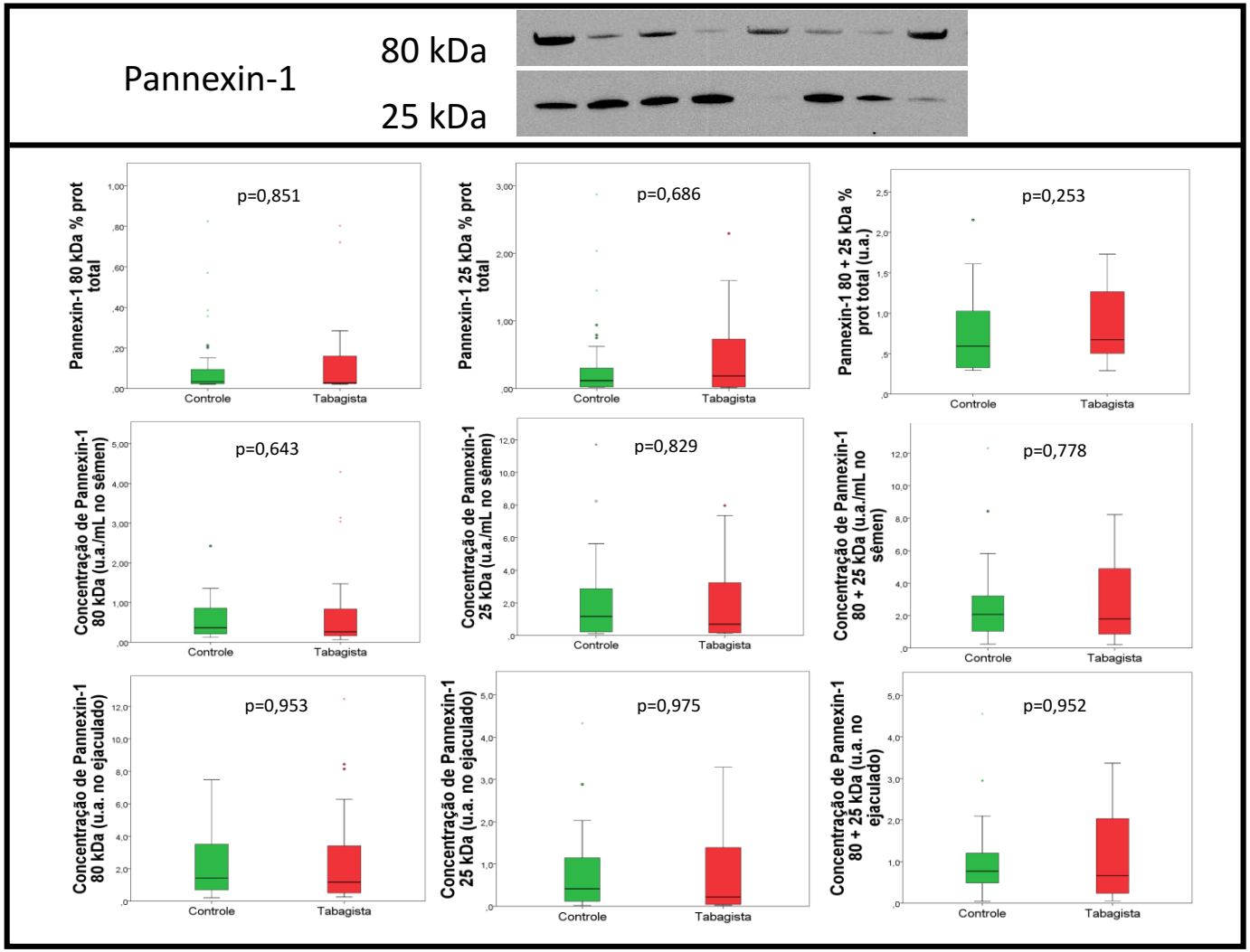

Figura 7. Análise dos níveis seminais da proteína Pannexin-1 nos grupos controle e tabagista. Imagem dos resultados de *Western blotting*, analisados por quimioluminescência. *Box-plot* da porcentagem de proteína total, concentração no sêmen (valor por mL de sêmen) e do nível total no ejaculado (concentração multiplicada pelo volume ejaculado). u.a. – unidades arbitrárias; * - diferença estatisticamente significativa; °- *outlier* (p<0,05, teste de *Mann-Whitney*).

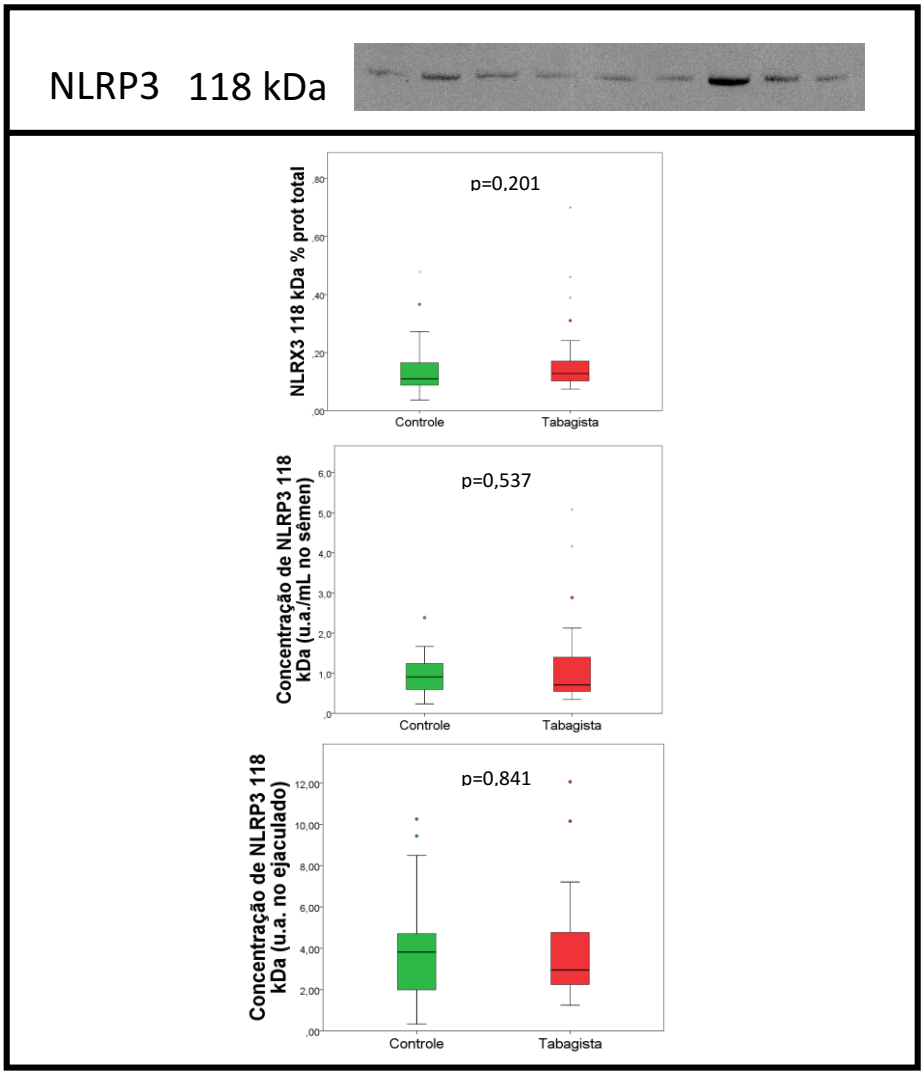

Figura 8. Análise dos níveis seminais da proteína NLRP3 nos grupos controle e tabagista. Imagem dos resultados de *Western blotting*, analisados por quimioluminescência. *Box-plot* da porcentagem de proteína total, concentração no sêmen (valor por mL de sêmen) e do nível total no ejaculado (concentração multiplicada pelo volume ejaculado). u.a. – unidades arbitrárias; * - diferença estatisticamente significativa; °- *outlier* (p<0,05, teste de t de *Student*).

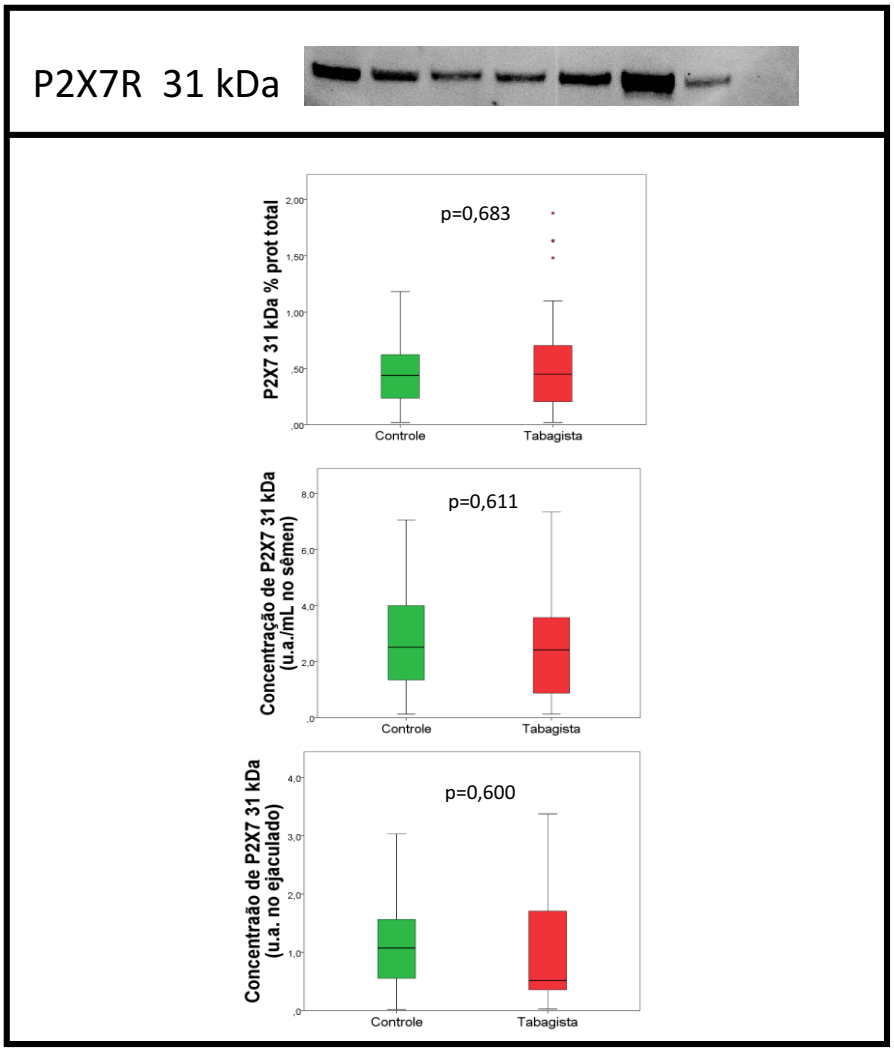

Figura 9. Análise dos níveis seminais da proteína P2X7R nos grupos controle e tabagista. Imagem dos resultados de *Western blotting*, analisados por quimioluminescência. *Box-blot* da porcentagem de proteína total, concentração no sêmen (valor por mL de sêmen) e do nível total no ejaculado (concentração multiplicada pelo volume ejaculado). u.a. – unidades arbitrárias; * - diferença estatisticamente significativa; °- *outlier* (p<0,05, teste de t de *Student*).

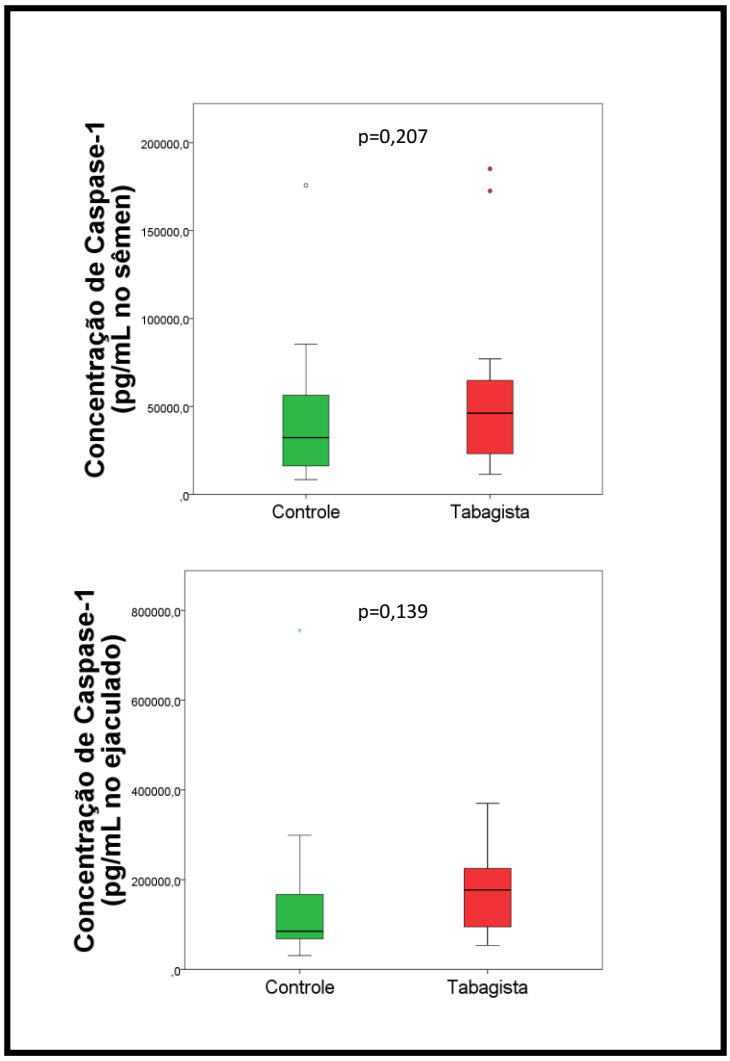

Figura 10. Análise dos níveis seminais da citocina Caspase-1 nos grupos controle e tabagista. *Box-plot* da concentração no sêmen (valor por mL de sêmen) e do nível total no ejaculado (concentração multiplicada pelo volume ejaculado). u.a. – unidades arbitrárias; * - diferença estatisticamente significativa; °- *outlier* (p<0,05, teste de t de *Student*).

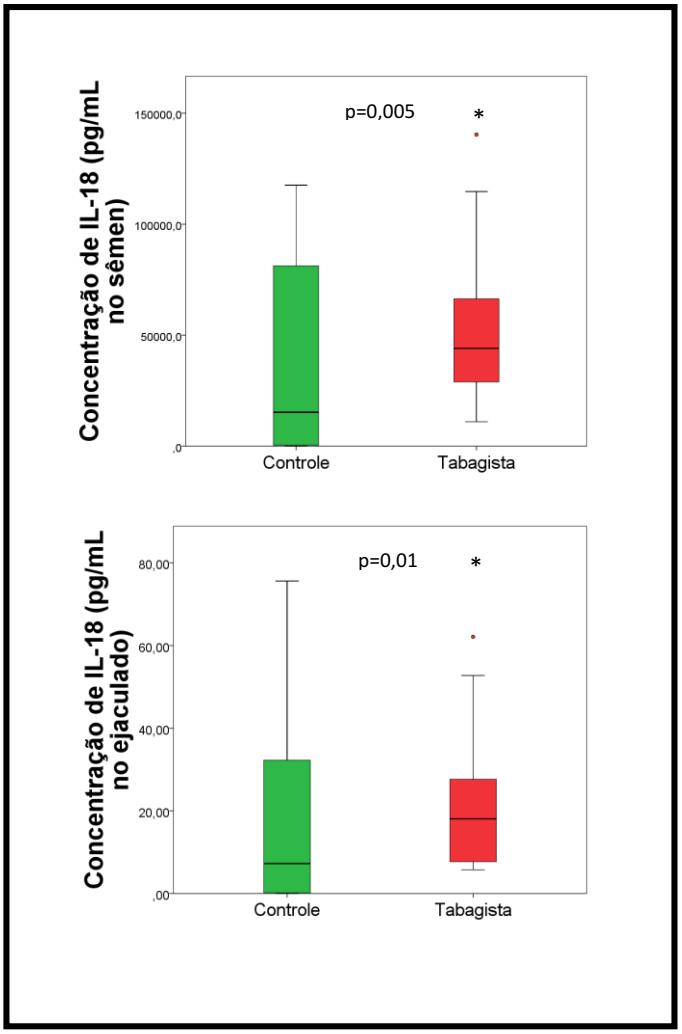

Figura 11. Análise dos níveis seminais da citocina IL-18 nos grupos controle e tabagista. *Box-plot* da concentração no sêmen (valor por mL de sêmen) e do nível total no ejaculado (concentração multiplicada pelo volume ejaculado). u.a. – unidades arbitrárias; * - diferença estatisticamente significativa; °- *outlier* (p<0,05, teste de t de *Student*).

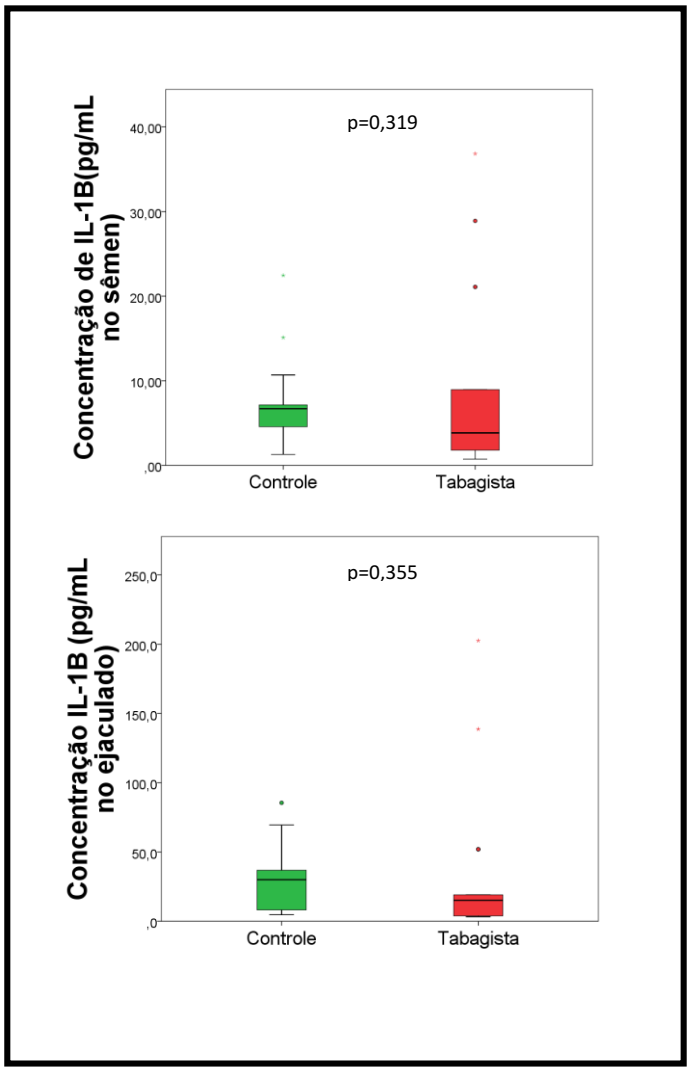

Figura 12. Análise dos níveis seminais da citocina IL-1β nos grupos controle e tabagista. *Box-plot* da concentração no sêmen (valor por mL de sêmen) e do nível total no ejaculado (concentração multiplicada pelo volume ejaculado). u.a. – unidades arbitrárias; * - diferença estatisticamente significativa; °- *outlier* (p<0,05, teste de t de *Student*).

5 DISCUSSÃO

O plasma seminal possui a importante função de nutrir do e transportar o gameta masculino e também de modular a função e a interação dos espermatozoides com o trato reprodutor feminino, especialmente com relação aos componentes do sistema imune, tanto masculino quanto feminino (121), Nesse contexto de imunomodulação, o plasma seminal possui uma variedade de moléculas que regulam esse sistema, como as citocinas (interleucinas 1 α, 2, 4, 5, 6, 7, 10, 11, 12, 13, 17, 18 e 23), fator de necrose tumoral (TNFα), quimiocinas (IL-8), fatores de crescimento (TGFα e β), dentre outros (122,123). Nesse contexto, devemos considerar a atuação dessas substâncias não somente em condições de desequilíbrio, mas também em situações fisiológicas normais.

No testículo, as citocinas e os outros reguladores imunológicos são produzidos principalmente pelas células somáticas, incluindo as células de Sertoli e Leydig, e estão envolvidas na regulação da espermatogênese (124). Porém, alguns estudos demonstram que a produção dessas citocinas pode ocorrer nas glândulas acessórias do sistema reprodutor masculino, como a próstata e vesícula seminal, bem como no epidídimo (125–128). A liberação dessas citocinas é regulada pelas células presentes no trato genital masculino, incluindo os macrófagos, monócitos, linfócitos, células dendriticas, pela resposta a antígenos e patógenos e pela inflamação crônica (129).

As citocinas não atuam isoladamente, mas sim em conjunto com outras citocinas, formando complexos, que podem amentar a toxicidade local gerando hiperrespostas. Um exemplo é a IL-18 em associação à IL-12, que já foram caracterizadas como importantes fatores na geração da peroxidação lipídica seminal, culminando em maiores níveis de fragmentação de DNA no espermatozoide (130). A atuação dessas citocinas pró-inflamatórias e a consequente redução de citocinas anti-inflamatórias também já foi descrita, podendo ser mais um modelo de resposta ao estímulo externo (131).

O processo inflamatório no trato reprodutor masculino pode causar dano testicular, obstrução e ainda afetar a função do espermatozoide. A secreção de citocinas é o primeiro sinal de alerta gerado pelo sistema imune no combate à inflamação ou infecção. As quimiocinas atuam em sinergismo com células como

os leucócitos, atraindo-os para o local de ação, gerando uma resposta intensa ou até crônica (132). Macrófagos e neutrófilos no local da inflamação liberam espécies reativas de oxigênio, além de citocinas e outros fatores de regulação imunológica, os quais já foram associados a danos no espermatozoide. Alguns autores sugerem que a leucocitospermia seja um indicativo de infecção das glândulas acessórias masculinas, caracterizada principalmente por níveis aumentados de IL-1β e IL-18 (133). Ainda, esses tipos celulares associados à resposta imune, como monócitos e macrófagos, bem como neutrófilos e células dendríticas podem expressar receptores para componentes do complexo inflamassomo, um importante regulador da resposta imune inata (134).

Um estudo anterior do nosso grupo identificou um painel de proteínas diferencialmente expressas em homens tabagistas, além de identificar funções celulares e moleculares enriquecidas no plasma seminal (14). Dentre as principais, podemos destacar aquelas associadas a resposta inflamatória (ativação do complemento, regulação de citocinas e apresentação e processamento de antígenos). De maneira geral, pois, o sêmen de homens tabagistas apresenta um aspecto inflamatório. Um estudo proposto por Zhang *et al.* (119) verificou a presença do complexo inflamassomo no sêmen de pacientes com lesão medular, através da mensuração de citocinas inflamatórias (caspase 1, IL-18 e IL 1β) e do ASC. Este estudo demonstrou que, nestes pacientes, essas citocinas e o ASC estavam aumentados nos pacientes com lesão medular. Este aumento poderia ser o responsável pela infertilidade desses pacientes, causada principalmente pela baixa motilidade (135). No presente estudo, levando em consideração o aspecto inflamatório do plasma seminal, hipotetizamos que pacientes tabagistas poderiam apresentar esses níveis de moléculas inflamatórias aumentados.

No presente estudo, foram verificados níveis diminuídos da proteína ASC e aumentados da IL-18 no plasma seminal de homens tabagistas. O aumento de IL-18 e a diminuição do ASC, mas não de outros componentes do inflamassomo indica que, possivelmente, sua ativação possa ter ocorrido por meio da via não canônica (136,137). Essa via leva a ativação da caspase-11 (caspase 4 e 5 em humanos) ou caspase-8, independente do recrutamento da pró-caspase-1 (138). A ativação da caspase-8 em leucócitos requer a presença do ASC e do NLRP3, regulando a maturação da IL-1β. Já em células epiteliais, foi descrito que a

secreção da IL-18 necessita da atividade da caspase-4 e é independente da caspase-1. Experimentos realizados por siRNA *knockdown* com depleção de caspase-1 demonstraram que todos os níveis de IL-18 secretados foram derivados da atividade da caspase-4 (138). A IL-18 é sintetizada como um precursor inativo de 23 kDa, que requer uma clivagem por uma caspase inflamatória ativa para obter sua forma ativa de 18 kDa. Sua função é promover a ativação de células *natural killer* e T, bem como a liberação de interferon γ, aumentando os níveis de moléculas de adesão celular, síntese de óxido nítrico e produção de quimiocinas; diferentemente, temos a IL-1β, que recruta neutrófilos para o local da inflamação (139). Os principais locais de IL-18 ativa são os macrófagos e as células dendríticas, porém sua forma inativa é constitutiva de células epiteliais. Uma propriedade única da IL-18 é a indução de *Fas* ligante (140), cuja presença já foi demonstrada pelo nosso grupo em adolescentes com varicocele e com baixa concentração de espermatozoides (141). A caspase-4 é capaz de clivar a IL-18 (142) no mesmo local de processamento da caspase-1 (143), ativando o inflamassomo e consequentemente a piroptose, uma forma de morte celular mediada por inflamação (144). Porém, esse mecanismo ainda necessita de mais experimentos para ser completamente elucidado, uma vez que os trabalhos disponíveis avaliaram esse mecanismo em células intestinais ou em macrófagos.

No presente estudo não encontramos níveis aumentados de NLRP3 no plasma seminal de homens tabagistas. A NLRP3 participa da família dos receptores NLR, que compreende cinco subfamílias, das quais a NLRC e NLRP são as melhores caracterizadas. Sabe-se que a ativação da NLRP3 ocorre na presença de PAMPS - Padrões Moleculares Associados a Patógenos (substâncias microbianas que estimulam a imunidade inata, como os ácidos nucleicos, proteínas, lipídeos de parede celular e carboidratos) e DAMPS - Padrões Moleculares Associados a Danos (são substâncias endógenas produzidas ou liberadas por células mortas ou danificadas causadas por infecções) (145). Porém, ainda não foram elucidados os mecanismos pelas quais as outras NLR são ativadas.

Um estudo identificou a ativação do complexo inflamassomo independentemente da Nalp 3 (inserida na família das NLR) mas dependente do ASC (146), demonstrando que este complexo possui inúmeras formas de

ativação. A ativação do NLRP3 é mediada pela Pannexin-1, um canal formador de poro que facilita a liberação de ATP e íons potássio. O ATP liberado via Pannexin-1 ativa o receptor de purina P2X7, resultando em um efluxo adicional de potássio (147). No presente estudo não foram encontrados níveis aumentados dessas proteínas, corroborando o fato de que a via dependente de NLRP3 pode não estar ativada em tabagistas. Um outro estudo realizado com camundongos *knockout* para Caspase-1 verificou que a NLRP1b e a NLRC4 induzem apoptose em macrófagos e células epiteliais ,dependentemente de ASC e caspase-8.Interessantemente, esse processo resultaem apoptose e não na piropoptose, característica clássica do complexo inflamassomo (148).

Sendo assim, podemos sugerir que a inflamação presente no plasma seminal de homens tabagistas pode ativar o complexo inflamassomo por meio da via não-canônica, mediada pela caspase-11, independente de uma proteína acopladora (ASC), com posterior liberação de IL-18.

6 CONCLUSÃO

Os resultados permitem concluir que há atividade do complexo inflamassomo no plasma seminal de tabagistas, indicando a atividade da imunidade inata.

ESTUDO 3

Avaliação dos níveis de expressão de *heat shock proteins* no plasma seminal de homens tabagistas

1 INTRODUÇÃO

A maturação correta do espermatozoide depende da perda, modificação e/ou remodelamento de proteínas no espermatozoide, em resposta a estímulos do meio, incluindo o trato reprodutor feminino (149). Por meio da aplicação de novas tecnologias moleculares de análise bioquímica e proteômica, muitas dessas proteínas têm sido identificadas. Dentre estas, as proteínas da classe das chaperonas parecem ter um papel indispensável em todos os processos de maturação e capacitação espermática (150).

As *Heat shock proteins* (HSP) são uma família de proteínas conservadas e que possuem um papel importante na homeostase celular e proteção contra agentes estressores externos. Estas proteínas são conhecidas como chaperonas, ou seja, proteínas que auxiliam outras proteínas, e sua expressão está geralmente associada a elevações de temperatura, estresse físico ou químico, infecções por diversos patógenos, drogas, dentre outros fatores (151); entretanto, há HSPs constitutivas, podendo participar de processos fisiológicos, e sua expressão está menos suscetível à indução por estresse térmico (152). As HSP são categorizadas de acordo com o seu tamanho, e a família das HSP incluem as HSP 70, HSP 27, HSP 60, HSP 90 e HSP 100. A atuação dessas chaperonas está intrinsicamente ligada à prevenção do dobramento incorreto das proteínas, bem como da aceleração do seu dobramento para exercer sua função corretamente (153).

Alguns estudos sugerem que as HSP são proteínas reguladoras do sistema imunológico inato e adaptativo, podendo ser encontradas em diversos tipos celulares e tecidos (154). Algumas HSP, como a 60 são normalmente encontradas nas mitocôndrias e estão expressas nos estágios iniciais da espermatogênese, principalmente nas espermatogônias (155). Esta expressão parece desaparecer nos estágios posteriores da espermatogênese, reaparecendo após a passagem dos espermatozoides pela cauda do epidídimo (156). Estas *heat shock proteins* são responsáveis pelo transporte e remodelamento das proteínas. Já a HSP 70 está associada à ligação a peptídeos que foram recentemente sintetizados ou que foram desnaturados, prevenindo a agregação e permitindo, assim, que estas se remodelem para uma forma ativa (157). A HSP 90 é uma das chaperonas mais abundantes e está presente de 1

a 2 % do total de proteínas, e está geralmente associada a HSP 70, prevenindo a agregação e melhorando o dobramento das proteínas (158). Ainda, esta proteína é um alvo para a fosforilação de tirosina, extremamente importante no processo de capacitação espermática (159). Por fim, as HSP 27 parecem atuar ativamente na espermiogênese; seu papel principal está na mediação entre os filamentos de actina do citoesqueleto e o formato celular, atuando na polimerização da actina (160).

2 OBJETIVO

Verificar se o tabagismo altera a os níveis de expressão de *heat shock proteins* (HSP) no plasma seminal.

3 MÉTODO

3.1 Pacientes

Este estudo foi realizado no Departamento de Cirurgia, Disciplina de Urologia da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP) e foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa dessa Universidade (CAAE número43590015.7.0000.5505). Todos os homens incluídos neste estudo assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido. Este estudo foi financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), por meio de bolsa de doutorado (processo número 140995/2016-1).

Foi realizado um estudo transversal incluindo pacientes com idade entre 20 e 50 anos que procuraram o Laboratório de Andrologia do Setor de Reprodução Humana da Disciplina de Urologia, Departamento de Cirurgia, da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP). As coletas seminais foram realizadas após a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) pelos pacientes. Os pacientes foram divididos em dois grupos: controle (n=35) e tabagistas (n=31).

Durante a avaliação clínica dos pacientes ou voluntários, realizada por médicos do setor, um questionário foi preenchido para cada indivíduo, incluindo dados sobre estilo de vida, índice de massa corpórea (IMC), presença ou ausência de varicocele e histórico médico. A varicocele foi diagnosticada por exame físico, incluindo palpação escrotal em sala com temperatura (>23 °C) e iluminação adequadas, com o homem em posição ortostática. Na presença de varicocele, esta foi classificada de acordo com Dubin e Amelar (59) em: grau I (dilatação do cordão espermático palpável apenas com a manobra de Valsalva), grau II (dilatação do cordão espermático facilmente palpável, demonstrando-se acentuado enchimento venoso durante a manobra de Valsalva) ou grau III (dilatação volumosa do cordão espermático facilmente visualizada e ectasia intensificada durante manobra de Valsalva). Com base nesse questionário, foram selecionados os indivíduos deste estudo, os quais coletaram as amostras seminais por masturbação, com dois a cinco dias de abstinência ejaculatória e em recipientes de polipropileno estéreis (60).

Para o grupo controle, foram selecionados homens com volume ejaculado ≥ 1,5 mL, concentração de espermatozoides ≥ $15x10^6$/mL de sêmen, motilidade progressiva ≥ 32%, morfologia estrita ≥ 4% e concentração de leucócitos inferior a $1x10^6$/mL de sêmen. Para o grupo tabagismo, foram incluídos apenas indivíduos que usavam pelo menos 10 cigarros por dia. Os fatores de exclusão para todos os grupos foram: obesidade, histórico de febre num período de noventa dias anterior à coleta do sêmen, evidências de infecção urogenital, uso de drogas de abuso e histórico de câncer e cirurgias no trato urogenital ou endocrinopatias.

3.2 Desenho experimental

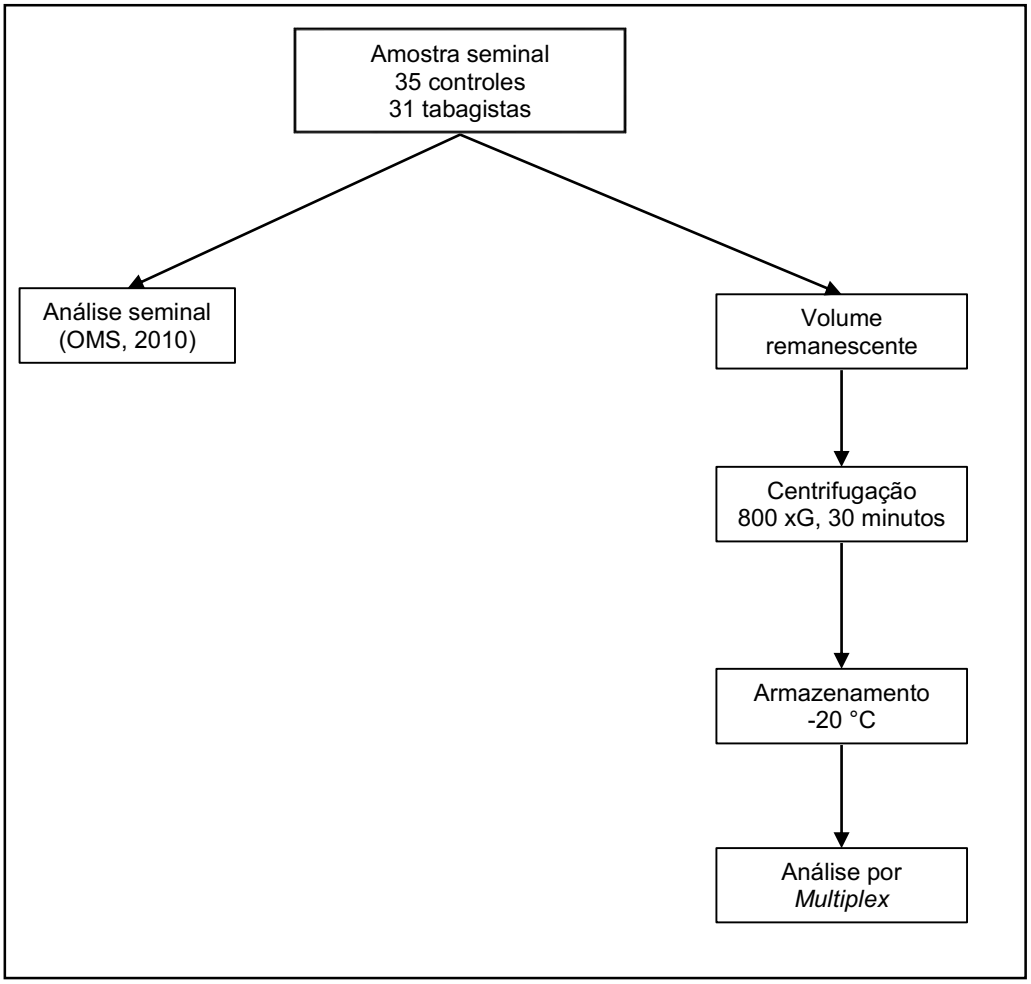

Figura 13. Desenho experimental do estudo 3. Avaliação dos níveis de expressão de heat shock proteins no plasma seminal de homens tabagistas.

Após a liquefação, uma alíquota do sêmen foi submetida ao espermograma convencional, realizada no Laboratório de Andrologia da UNIFESP, de acordo com as recomendações da Organização Mundial da Saúde de 2010 (1). O volume restante das amostras foi imediatamente encaminhado ao Centro de Pesquisa em Urologia da UNIFESP para realização da parte experimental. A amostra foi centrifugada a 800 x*G* por 30 minutos e o plasma seminal sobrenadante foi congelado sem adição de crioprotetores e mantido a -20 °C até o momento da análise por *multiplex*. No momento das análises, as amostras foram centrifugadas a 16.000 xG por uma hora a 4 ºC para remover o restante dos debris celulares. O sobrenadante, então, foi retirado e utilizados para as análises.

3.3 Análise da expressão de proteínas por ensaio *Multiplex*

Inicialmente, realizamos a quantificação de proteínas totais do plasma seminal de cada amostra, utilizando o método de Ensaio de Proteína BCA (Ácido Bicinconínico - Método de Lowry modificado) (61) como descito no estudo 1.

Para este estudo, cinco biomarcadores proteicos foram analisados por *Multiplex*: HSP27 (Total), HSP27 (pS78/pS82), HSP60, HSP70 (HSP72), e HSP90 alpha (Millipore kit 48-615MAG). Após a quantificação pelo BCA, um volume correspondente a 4 µg/mL de plasma seminal foi utilizado para as análises das *Heat Shock Proteins* (HSPs). O protocolo seguiu as instruções do fabricante e todos os reagentes descritos são parte do kit do *MAGPIX*.

Para a detecção das HSPs no plasma seminal, foi adicionado 50 µL de *Assay Buffer* em cada poço de uma placa de 96 poços. A placa foi, então, colocada em *shaker* por 10 minutos, em temperatura Para a detecção das HSPs no plasma seminal, foi adicionado 50 µL de *Assay Buffer* em cada poço de uma placa de 96 poços. A placa foi, então, colocada sob agitação por 10 minutos, em temperatura ambiente (20-25 °C). O *Assay Buffer* foi decantado e o volume residual foi removido da placa por inversão em um papel toalha absorvente. Foram adicionados 25 µL da suspensão de *HSP Panel Magnetic beads (1X)* em todos os poços e 25 µL de *HeLa Cell Lysate Unstimulated,* 25 µL de *HeLa Cell Lysate HS/Ars and* 25 µL de *Assay Buffer* em seus respectivos poços. Ainda, um volume de 25 µL de amostra diluída em *Assay Buffer* (em uma concentração fina

de 4 µg/mL) foi adicionado nos poços correspondentes. A placa foi, então, incubada *overnight* (16-18 horas), a 4°C, sob agitação (600-800 rpm) e ao abrigo da luz.

Após a incubação, o separador magnético foi acoplado à placa por 60 segundos, para que as *beads*, controles e amostras decantem. Após a lavagem da placa com *Assay Buffer* por duas vezes, foram adicionados 25 µL de *HSP Panel, Biotin (1X)* (anticorpo de detecção) em cada poço, e a placa foi mantida sob agitação por 1 hora, em temperatura ambiente. O separador magnético foi acoplado novamente, por 60 segundos, para que as *beads* e o anticorpo de detecção decantem. Então, 25 µL *Streptavidin-Phycoerythrin* foram adicionados em todos os poços e a placa foi incubada sob agitação por 15 minutos, em temperatura ambiente. Então, 25 µL do *Amplification Buffer (1X)* foram adicionados em cada poço e a placa foi novamente incubada sob agitação, por 15 minutos em temperatura ambiente. O separador magnético foi acoplado novamente, por 60 segundos, para que as *beads*, *Streptavidin-Phycoerythrin* e o *Amplification Buffer* decantem. Foram adicionados 150 µL de *Assay Buffer* para ressuspender as *beads* e a placa foi mantida sob agitação por 5 minutos. A leitura da placa foi feita pelo equipamento *MAGPIX® (Millipor*e) e o *xPONENT software.*

3.4 Análise estatística

Para a análise estatística, foi utilizado o *software* PAWS (SPSS) 18.0. Primeiramente, foi avaliada a normalidade da distribuição dos dados com o teste de *Kolmogorov-Smirnov*. Variáveis que não apresentaram distribuição normal dos dados foram transformadas aos seus valores logarítmicos anteriormente à realização da análise univariada. Para as variáveis que mesmo após a transformação não apresentaram distribuição normal, utilizamos o teste de Mann-Whitney. Os grupos foram comparados pelo teste t de *Student* para amostras não pareadas e pelo teste *Mann-Whitney* para as variáveis porcentagem de espermatozoides não progressivos, células redondas, neutrófilos e contagem total de espermatozoides. Para todos os casos, um alfa de 5% foi adotado.

4 RESULTADOS

Os dados da análise estatística descritiva das análises seminal, bem como da expressão de proteínas estão descritos nas Tabelas 3 e 4. Para os dados da análise seminal, o grupo tabagista apresentou menor concentração de espermatozoides (p=0,004), menor contagem total de espermatozoides (p<0,001), menor motilidade progressiva (p=0,018), maior porcentagem de espermatozoides imóveis (p=0,012) e menor porcentagem de espermatozoides morfologicamente normais (p=0,014).

Com relação a expressão de *heat shock proteins*, somente a HSP 90 alpha apresentou-se diminuída no grupo tabagista (p=0,014).

Tabela 9: Idade e qualidade seminal de tabagistas e controles incluídos no estudo

	Controle (n=35)	Tabagista (n=31)	p
Volume ejaculado (mL)			
Média; DP	3,8; 1,45	3,3; 1,37	0,191
IC 95%	[3,3 - 4,3]	[2,8 - 3,8]	
Concentração de espermatozoides (milhões/mL)			
Média; DP	106,0; 80,6	56,5; 46,2	**0,004***
IC 95%	[78,3 - 133,7]	[39,5 - 73,5]	
Contagem Total de espermatozoides (milhões)			
Mediana; IQ	306,4; 230,4	126,0; 190,9	**<0,001***
Q1-Q3	218,0-409,6	62,0-243,6	
Motilidade progressiva dos espermatozoides (%)			
Média; DP	51,4; 9,8	43,3; 15,6	**0,018***
IC 95%	[48,0 - 54,8]	[37,6 - 49,1]	
Motilidade não progressiva dos espermatozoides (%)			
Mediana; IQ	5,0; 4,0	4,0; 3,0	0,495
Q1-Q3	4,0-7,5	4,0-6,5	
Imotilidade dos espermatozoides (%)			
Média; DP	42,8; 9,7	50,8; 14,2	**0,012***
IC 95%	[39,5 - 46,2]	[45,6 - 56,0]	
Morfologia dos espermatozoides (%)			
Média; DP	7,0; 2,6	5,1; 3,4	**0,014***
IC 95%	[6,1 - 7,9]	[3,8 - 6,3]	
Células redondas (milhões/mL)			
Mediana; IQ	0,9; 1,3	0,9; 1,8	0,274
Q1-Q3	0,4-1,6	0,6-2,2	
Neutrófilos (milhões/mL)			
Mediana; IQ	0,0; 0,0	0,0; 0,2	0,113
Q1-Q3	0,0-0,0	0,0-0,1	

* Diferença significativa (p<0,05).
IQ: Intervalo interquartil
Q1: Primeiro quartil
Q3: Terceiro quartil

Tabela 10: Expressão das proteínas HSP 27 (total), HSP (pS78/pS82), HSP 60, HSP 70 e HSP 90 alpha nos grupos controle e tabagista.

	Controle (n=35)	Tabagista (n=31)	p
HSP 27 (total)			
Média; DP	157,0; 138,1	313,6; 1117,4	0,292
IC 95%	[108,8 - 205,2]	[0,0 - 723,5]	
HSP 27 (pS78/pS82)			
Média; DP	157,4; 168,0	335,5; 440,7	0,100
IC 95%	[71,0 - 243,8]	[0,0 - 1430,4]	
HSP 60			
Média; DP	4,9; 3,3	6,8; 14,4	0,504
IC 95%	[3,7 - 6,14]	[0,0 - 14,5]	
HSP 70 (HSP 72)			
Média; DP	12,1; 7,8	26,2; 98,7	0,467
IC 95%	[9,4 - 14,8]	[0,0 - 65,2]	
HSP 90 alpha			
Média; DP	37,4; 45,7	15,9; 13,1	**0,014***
IC 95%	[21,6 - 53,1]	[11,0 - 20,8]	

* Diferença significativa (p<0,05).
DP - Desvio Padrão
IC 95% - Intervalo de confiança de 95% da média

5 DISCUSSÃO

Células podem responder a uma variedade de estímulos, fisiológicos ou não, sintetizando proteínas conhecidas como *Heat Shock Proteins* (HSP). A indução da expressão dessas moléculas protege as células de uma gama enorme de agentes estressores, como o estresse térmico, agentes quimioterápicos, subnutrição, radiação e inflamação. Inicialmente o estudo das HSP mostrou sua ação como chaperonas corretoras do dobramento errôneo de proteínas, acelerando seu redobramento e renaturação (161). Porém, mais recentemente as HSP têm demonstrado sua função anti-apoptótica, independente de sua habilidade como chaperona (162).

A função regulatória das HSP depende de sua habilidade em interagir com outras proteínas ou polipeptídeos. Alguns estudos demonstram que essas proteínas regulam os processos de apoptose em resposta a diversos estímulos. A inibição da proteólise e da atividade de caspases já foi descrita para a HSP 70, bem como a regulação da morte celular mediada pelo citocromo c pela HSP 27 (163,164).

Com relação ao estudo das *Heat Shock Proteins* no plasma seminal, este estudo identificou níveis diminuídos da HSP 90 alpha no grupo tabagista. A HSP 90 alpha é uma proteína citosólica e não necessária para o dobramento *de novo* de proteínas, mas facilita a maturação final de proteínas clientes, como as proteínas quinases, fatores de transcrição e receptores de hormônios esteroides (165). A HSP 90 alpha é induzida sob condições de estresse, e sua ligação a nucleotídeos regula sua conformação, essencial para o equilíbrio dinâmico necessário para sua função (166,167).

O estudo dessa proteína em camundongos knockout demonstrou que, a ausência do gene HSP 90aa1 provoca a esterilização completa do animal, prejudicando a meiose provavelmente por danificar a dinâmica da formação dos microtúbulos. Esse defeito parece ser uma associação do gene HSP90aa1 e o CDC2 (quinase reguladoras das fases G2/M). Essa isoforma parece ser extremamente necessária na primeira etapa da espermatogênese, e sua ausência não é compensada pela isoforma beta da HSP90. Na ausência da HSP90 alpha, a parada da meiose na fase de paquíteno gera uma perda de

células germinativas, resultando em túbulos seminíferos vazios e um tamanho testicular reduzido (168). Essa proteína também forma interações importantes com proteínas nucleares, essenciais para o transporte de histonas, do citoplasma de espermatócitos primários para o núcleo, regulando a meiose I (169).

As HSP presentes no citosol de células somáticas possuem inúmeras funções. Porém, uma grande variedade dessas proteínas são expressas nos espermatozoides, sugerindo sua participação na função correta do gameta (170–172). Um estudo demonstrou que a HSP90 alpha está presente na junção entre a cabeça e a peça intermediária do espermatozoide, indicando sua importância no espermatozoide ejaculado e não somente nas fases iniciais da gametogênese (173). A junção entre a cabeça e a peça intermediária do espermatozoide é chamada de envelope residual nuclear e contém restos citoplasmáticos, incluindo chaperonas, e é o local de armazenamento de cálcio nos espermatozoides (174). A presença da HSP90alpha nessa região pode caracteriza-la como uma proteína constituinte do envelope residual, relacionada a homeostase do cálcio. Ademais, um estudo recente demonstrou que a inibição da HSP90 afeta o influxo de cálcio em espermatozoides humanos capacitados, demonstrando sua importância no processo de fertilização (175). A inibição da HSP90 também demonstrou diminuir a motilidade, a hiperativação e a reação acrossômica em espermatozoides humanos. Ainda, os níveis de HSP90alpha estavam diminuídos em pacientes oligoastenozoospérmicos (173). Podemos associar esses resultados com os do presente estudo, o qual verificamos uma menor concentração e motilidade dos espermatozoides no grupo tabagista.

Mais recentemente o estudo das *Heat Shock Proteins* como imunomoduladoras tem ganhado destaque, uma vez que estão presentes em algumas doenças autoimunes e câncer (176). O sistema imune consiste na imunidade inata e na adaptativa. A inata fornece a primeira linha de defesa contra microorganismos e consiste em mecanismos de defesa celulares e bioquímicos que estão preparados para reagir aos produtos de microorganismos e células lesionadas, dentre outros fatores. Os principais componentes dessa imunidade são os neutrófilos, macrófagos, células dendríticas, *natural killer (NK)*, proteínas do sistema complemento e outros mediadores da inflamação. A imunidade adaptativa é caracterizada pela estimulação repetida do sistema imune a um

agente agressor, o que aumenta em magnitude e capacidade defensiva em cada exposição, desenvolvendo uma adaptação à infecção (177).

A HSP90 α é predominantemente citosólica, porém pode também apresentar-se na superfície celular, em condições fisiológicas ou de desequilíbrio/doenças (178–181), facilitando o dobramento e a atividade de receptores nas células Nk e nos linfócitos T (176). A expressão de células apresentadoras de antígenos, resultante do estímulo do sistema imune, concomitantemente com moléculas coestimulatórias (CD80/86) leva à ativação das citocinas que iniciam o recrutamento das células respondedoras Nk e T, potencializando o efeito reparador da agressão (182–184).

A forma intracelular da HSP90 liga-se a proteínas antigênicas que facilitam o processamento para a formação de peptídeos. Esses peptídeos são apresentados ao MHC de classe I ou II pela HSP 90 (176). Já a forma extracelular liga-se a substratos dos peptídeos antigênicos e interage com receptores de superfície, que facilitam a captura do complexo HSP90-antígeno por endocitose. Após a internalização dos antígenos, a HSP facilita a passagem dos peptídeos para a degradação pelo proteassoma. Após a clivagem em pequenos peptídeos, estes são transportados para o retículo endoplasmático e/ou complexo de Golgi (185). Portanto, a HSP 90 facilita a mediação da apresentação de antígenos às células da imunidade inata (186).

Como no presente estudo o nível seminal de HSP 90 alpha estava diminuído, deste resultado surgem duas principais possibilidades a se discutir. Por um lado, poder-se-ia hipotetizar que os níveis mais baixos devem-se a uma maior atividade da HSP 90 extracelular em captar peptídeos antigênicos para resposta imune. Como no tabagismo há incremento no recrutamento de leucócitos (12), essa hipótese serve para explicar os efeitos observados em tabagistas – a saber, diminuição de motilidade e aumento de alterações funcionais dos espermatozoides.

Contudo, uma segunda hipótese a ser considerada é a de que o nível reduzido de HSP 90 deva-se a alteração em sua expressão ou secreção. Nesse caso, poder-se-ia discutir que os eventos adversos causados pelo tabagismo também gerariam alteração na expressão de proteínas dessas vias, assim como observado em outras vias (14). Interessantemente, a forma citosólica da HSP90 é secretada via exossomos, que são pequenas vesículas derivadas da própria

célula e que são liberadas por diversos tipos celulares em vários fluidos biológicos (187). Essas microvesículas são liberadas para o espaço extracelular, podendo juntar-se com lisossomos para degradar proteínas, podem armazenar temporariamente alguma substância importante e fundir-se com a membrana plasmática (152,188). Esse transporte de substâncias mediado pelos exossomos pode modular a atividade de outras células, tornando-se uma importante ferramenta no controle da resposta celular (189). A alteração de proteínas exossomais em amostras seminais já foi demonstrada em alguns estudos (190,191).

Sendo assim, podemos hipotetizar que os pacientes tabagistas podem apresentar um prejuízo na formação dos espermatozoides, podendo impactar na concentração, motilidade e morfologia, assim como demonstrado no presente estudo. Ainda, esses pacientes podem apresentar uma resposta imunológica prejudicando a apresentação e o processamento de antígenos.

6 CONCLUSÃO

Os resultados permitem concluir que o tabagismo está associado a uma redução dos níveis seminais de *Heat Shock Protein 90 alpha*, o que indica uma desregulação do mecanismo homeostático de resposta ao estresse.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Estudos que utilizam a abordagem proteômica têm recentemente ganhado visibilidade na tentativa de usar essa tecnologia como uma ferramenta para entender os mecanismos moleculares que regulam diversas condições biológicas. As proteínas são moléculas que regulam a dinâmica do indivíduo, seja em seu estado fisiológico ou mediante estresse. Sendo assim, o estudo dessas moléculas em seu ambiente, bem como dos mecanismos pelos quais elas participam, torna-se essencial para o entendimento da condição estudada, como é o foco do presente estudo.

O tabagismo como condição clínica na população masculina tem grande importância mundial, pois a maioria dos homens que fumam estão em idade reprodutiva. Ainda, o foco do estudo nesses pacientes é uma forma de entender como ambas as condições podem estar associadas. Portanto, este trabalho teve como enfoque o estudo dos mecanismos moleculares seminais associados ao tabagismo. Para isso, um estudo anterior do nosso grupo que realizou a análise proteômica do plasma seminal de homens tabagistas comparados com controles, verificou que homens que fumam apresentam um perfil de proteínas diferente de homens não tabagistas, e esse perfil reflete essencialmente uma atividade imunológica exacerbada, caracterizada pela hiperexpressão de proteínas inflamatórias e que participam do sistema imune inato.

A base do raciocínio por meio do qual a presente tese foi delineada, pois, foi a de que o tabagismo leva a um estado seminal inflamatório, e desviado da homeostase. Pode ser demonstrado esse mesmo mecanismo em outras populações estudadas para a infertilidade masculina. Em homens sobreviventes de lesão à medula espinhal, há um incremento na produção de proteínas ligadas à resposta imune inata (119). Em adultos e adolescentes com varicocele, um estado seminal inflamatório já foi demonstrado, bem como um incremento na atividade imune inata (49–51,65,192), em algo que discutimos ser uma homeorese – um desvio do estado homeostático para um estado alterado equilibrado. Ainda, homens com elevação na taxa de fragmentação de DNA dos espermatozoides, e homens portadores de tumores de células germinativas de testículo também apresentam atividade inflamatória elevada no sêmen.

De maneira geral, os resultados da presente tese conduzem a esse raciocínio. O proteoma observado do plasma seminal apresenta alterações, em que duas proteínas com características de atuação na resposta imune inata e em atividade inflamatória estão particularmente desviadas em fumantes. Essas proteínas, interessantemente, participam de diversos mecanismos fundamentais para os espermatozoides, como na regulação do metabolismo do Cálcio, que participa da capacitação e da reação acrossômica (70).

Em seguida, observamos uma elevação nos níveis seminais de interleucina 18 – uma interleucina inflamatória seminal. Nos mesmos pacientes, demonstramos que a via de ativação parece ser a via do inflamassomo NLR-dependente, vez que os níveis de ASC também estavam elevados. Com isso, o tabagismo emula, no sêmen, o que é observado em homens com lesão medular – o aspecto inflamatório decorrente de elevada resposta imune inata.

Por fim, uma importante via de proteínas de resposta ao estresse, com participação no sistema seminal (150) não estava elevada. Esse resultado demonstra que, ao menos nos tabagistas deste estudo, que eram fumantes crônicos (como o tabagismo se expressa na população, de maneira geral), os mecanismos de hiper-expressão de proteínas da família das *Heat Shock Proteins* não estão presentes. Por outro lado, a HSP 90 estava diminuída, o que pode decorrer de atividade inflamatória e imune aumentada.

Com os resultados aqui apresentados, podemos caminhar com certa firmeza na direção de afirmar que o sêmen de homens tabagistas é inflamatório, com resposta imune inata aumentada. Dentre os próximos passos que podemos lucubrar a partir de nossos resultados, certamente um é o de identificar o tecido de origem dessa resposta inflamatória seminal. Como o plasma seminal é composto por secreções seminíferas, epididimárias, deferenciais, bem como das glândulas sexuais (próstata, vesículas seminais e glândulas bulbouretrais), identificar o tecido de origem pode auxiliar no entendimento dos pontos de maior atuação do tabagismo. Ademais, pode-se pensar, com isso, em métodos para reverter os (ou proteger dos) efeitos do tabagismo no sêmen, com o intuito de melhorar a qualidade dos espermatozoides. Outro passo é o de se verificar como a resposta inflamatória seminal se comunica com os espermatozoides. Como há intensa troca de informações entre os espermatozoides e as células do

epidídimo, é de interesse que se demonstre como a inflamação pode perturbar essa troca, e quais as consequências disso.

Por obvio, parar de fumar é o melhor primeiro passo. Mas seríamos de grande ingenuidade de considerarmos isso real e certo para toda a população. Os resultados do presente estudo, pois, podem, além do esclarecimento à comunidade científica dos pontos acima elencados, contribuir para elevar o arsenal de informações à disposição do poder público para propor políticas de conscientização da população quanto aos danos do tabagismo.

REFERÊNCIAS

1. World Health Organization, Department of Reproductive Health and Research. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. 2010. 287 p.

2. Brugh VM, Lipshultz LI. Male factor infertility: evaluation and management. Med Clin North Am. março de 2004;88(2):367–85.

3. Barazani Y, Katz BF, Nagler HM, Stember DS. Lifestyle, environment, and male reproductive health. Urol Clin North Am. fevereiro de 2014;41(1):55–66.

4. Curtis KM, Savitz DA, Arbuckle TE. Effects of cigarette smoking, caffeine consumption, and alcohol intake on fecundability. Am J Epidemiol. 1º de julho de 1997;146(1):32–41.

5. Secretaria de Vigilância em Saúde M da S. Vigitel Brasil 2011: Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico. 2012.

6. Benoff S, Gilbert BR. Varicocele and male infertility: part I. Preface. Hum Reprod Update. fevereiro de 2001;7(1):47–54.

7. Benoff SH, Millan C, Hurley IR, Napolitano B, Marmar JL. Bilateral increased apoptosis and bilateral accumulation of cadmium in infertile men with left varicocele. Hum Reprod Oxf Engl. março de 2004;19(3):616–27.

8. El Mulla KF, Köhn FM, El Beheiry AH, Schill WB. The effect of smoking and varicocele on human sperm acrosin activity and acrosome reaction. Hum Reprod Oxf Engl. dezembro de 1995;10(12):3190–4.

9. Fariello RM, Pariz JR, Spaine DM, Gozzo FC, Pilau EJ, Fraietta R, et al. Effect of smoking on the functional aspects of sperm and seminal plasma protein profiles in patients with varicocele. Hum Reprod Oxf Engl. novembro de 2012;27(11):3140–9.

10. Potts RJ, Newbury CJ, Smith G, Notarianni LJ, Jefferies TM. Sperm chromatin damage associated with male smoking. Mutat Res. 25 de janeiro de 1999;423(1–2):103–11.

11. Witt MA, Lipshultz LI. Varicocele: a progressive or static lesion? Urology. novembro de 1993;42(5):541–3.

12. Saleh RA, Agarwal A, Sharma RK, Nelson DR, Thomas AJ. Effect of cigarette smoking on levels of seminal oxidative stress in infertile men: a prospective study. Fertil Steril. setembro de 2002;78(3):491–9.

13. Sofikitis N, Miyagawa I, Dimitriadis D, Zavos P, Sikka S, Hellstrom W. Effects of smoking on testicular function, semen quality and sperm fertilizing capacity. J Urol. setembro de 1995;154(3):1030–4.

14. Antoniassi MP, Intasqui P, Camargo M, Zylbersztejn DS, Carvalho VM, Cardozo KHM, et al. Analysis of the functional aspects and seminal plasma proteomic profile of sperm from smokers. BJU Int. novembro de 2016;118(5):814–22.

15. Vine MF. Smoking and male reproduction: a review. Int J Androl. dezembro de 1996;19(6):323–37.

16. Trummer H, Habermann H, Haas J, Pummer K. The impact of cigarette smoking on human semen parameters and hormones. Hum Reprod Oxf Engl. junho de 2002;17(6):1554–9.

17. Ramlau-Hansen CH, Thulstrup AM, Aggerholm AS, Jensen MS, Toft G, Bonde JP. Is smoking a risk factor for decreased semen quality? A cross-sectional analysis. Hum Reprod Oxf Engl. janeiro de 2007;22(1):188–96.

18. Härkönen K, Viitanen T, Larsen SB, Bonde JP, Lähdetie J. Aneuploidy in sperm and exposure to fungicides and lifestyle factors. ASCLEPIOS. A European Concerted Action on Occupational Hazards to Male Reproductive Capability. Environ Mol Mutagen. 1999;34(1):39–46.

19. Hammadeh ME, Hamad MF, Montenarh M, Fischer-Hammadeh C. Protamine contents and P1/P2 ratio in human spermatozoa from smokers and non-smokers. Hum Reprod Oxf Engl. novembro de 2010;25(11):2708–20.

20. Fraczek M, Kurpisz M. Cytokines in the male reproductive tract and their role in infertility disorders. J Reprod Immunol. abril de 2015;108:98–104.

21. Haidl F, Haidl G, Oltermann I, Allam JP. Seminal parameters of chronic male genital inflammation are associated with disturbed sperm DNA integrity. Andrologia. maio de 2015;47(4):464–9.

22. Antoniassi MP, Intasqui Lopes P, Camargo M, Zylbersztejn DS, Carvalho VM, Cardozo KHM, et al. Analysis of the sperm functional aspects and seminal plasma proteomic profile from male smokers. BJU Int. 21 de maio de 2016;

23. Huang DW, Sherman BT, Lempicki RA. Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists. Nucleic Acids Res. janeiro de 2009;37(1):1–13.

24. Pilch B, Mann M. Large-scale and high-confidence proteomic analysis of human seminal plasma. Genome Biol. 2006;7(5):R40.

25. Pilch B, Mann M. Large-scale and high-confidence proteomic analysis of human seminal plasma. Genome Biol. 2006;7(5):R40.

26. Suarez SS. Mammalian sperm interactions with the female reproductive tract. Cell Tissue Res. janeiro de 2016;363(1):185–94.

27. Kumar V, Hassan MI, Tomar AK, Kashav T, Nautiyal J, Singh S, et al. Proteomic analysis of heparin-binding proteins from human seminal plasma: a step towards identification of molecular markers of male fertility. J Biosci. 2009;34(6):899–908.

28. 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.

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. 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.

31. Miller DJ, Winer MA, Ax RL. Heparin-binding proteins from seminal plasma bind to bovine spermatozoa and modulate capacitation by heparin. Biol Reprod. 1990;42(5–6):899–915.

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. Martínez-Heredia J, Estanyol JM, Ballescà JL, Oliva R. Proteomic identification of human sperm proteins. Proteomics. agosto de 2006;6(15):4356–69.

34. Oliva R. Protamines and male infertility. Hum Reprod Update. agosto de 2006;12(4):417–35.

35. Primakoff P, Myles DG. Penetration, adhesion, and fusion in mammalian sperm-egg interaction. Science. 2002;296(5576):2183–5.

36. Maillo V, Sánchez-Calabuig MJ, Lopera-Vasquez R, Hamdi M, Gutierrez-Adan A, Lonergan P, et al. Oviductal response to gametes

and early embryos in mammals. Reprod Camb Engl. 2016;152(4):R127-141.

37. Yanagimachi R. Fertility of mammalian spermatozoa: its development and relativity. Zygote Camb Engl. novembro de 1994;2(4):371–2.

38. Kölle S. Transport, Distribution and Elimination of Mammalian Sperm Following Natural Mating and Insemination. Reprod Domest Anim Zuchthyg. setembro de 2015;50 Suppl 3:2–6.

39. Tomar AK, Saraswat M, Chhikara N, Kumar S, Yadav VK, Sooch BS, et al. Differential proteomics of sperm: insights, challenges and future prospects. Biomark Med. dezembro de 2010;4(6):905–10.

40. 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. 4 de março de 2011;10(3):941–53.

41. Yanbaeva DG, Dentener MA, Creutzberg EC, Wesseling G, Wouters EFM. Systemic effects of smoking. Chest. maio de 2007;131(5):1557–66.

42. Meri ZB, Irshid IB, Migdadi M, Irshid AB, Mhanna SA. Does cigarette smoking affect seminal fluid parameters? A comparative study. Oman Med J. janeiro de 2013;28(1):12–5.

43. Künzle R, Mueller MD, Hänggi W, Birkhäuser MH, Drescher H, Bersinger NA. Semen quality of male smokers and nonsmokers in infertile couples. Fertil Steril. fevereiro de 2003;79(2):287–91.

44. Yu B, Qi Y, Liu D, Gao X, Chen H, Bai C, et al. Cigarette smoking is associated with abnormal histone-to-protamine transition in human sperm. Fertil Steril. janeiro de 2014;101(1):51-57.e1.

45. Pasqualotto FF, Sobreiro BP, Hallak J, Pasqualotto EB, Lucon AM. Cigarette smoking is related to a decrease in semen volume in a population of fertile men. BJU Int. fevereiro de 2006;97(2):324–6.

46. Abu D a. H, Franken DR, Hoffman B, Henkel R. Sequential analysis of sperm functional aspects involved in fertilisation: a pilot study. Andrologia. maio de 2012;44 Suppl 1:175–81.

47. Shiva M, Gautam AK, Verma Y, Shivgotra V, Doshi H, Kumar S. Association between sperm quality, oxidative stress, and seminal antioxidant activity. Clin Biochem. março de 2011;44(4):319–24.

48. Pennington SR, Wilkins MR, Hochstrasser DF, Dunn MJ. Proteome analysis: from protein characterization to biological function. Trends Cell Biol. abril de 1997;7(4):168–73.

49. 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. setembro de 2013;100(3):667–72.

50. 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. janeiro de 2013;99(1):92–8.

51. Camargo M, Intasqui Lopes P, Del Giudice PT, Carvalho VM, Cardozo KHM, Andreoni C, et al. Unbiased label-free quantitative proteomic profiling and enriched proteomic pathways in seminal plasma of adult men before and after varicocelectomy. Hum Reprod Oxf Engl. janeiro de 2013;28(1):33–46.

52. Fariello RM, Pariz JR, Spaine DM, Cedenho AP, Bertolla RP, Fraietta R. Association between obesity and alteration of sperm DNA integrity and mitochondrial activity. BJU Int. setembro de 2012;110(6):863–7.

53. 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. janeiro de 2012;109(2):259–65.

54. Blumer CG, Fariello RM, Restelli AE, Spaine DM, Bertolla RP, Cedenho AP. Sperm nuclear DNA fragmentation and mitochondrial activity in men with varicocele. Fertil Steril. novembro de 2008;90(5):1716–22.

55. 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. outubro de 2013;112(6):835–43.

56. 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. setembro de 2013;30(9):1187–202.

57. Drabovich AP, Dimitromanolakis A, Saraon P, Soosaipillai A, Batruch I, Mullen B, et al. Differential diagnosis of azoospermia with proteomic biomarkers ECM1 and TEX101 quantified in seminal plasma. Sci Transl Med. 20 de novembro de 2013;5(212):212ra160.

58. Vilagran I, Castillo J, Bonet S, Sancho S, Yeste M, Estanyol JM, et al. Acrosin-binding protein (ACRBP) and triosephosphate isomerase (TPI) are good markers to predict boar sperm freezing capacity. Theriogenology. 2013;80(5):443–50.

59. Dubin L, Amelar RD. Varicocelectomy: 986 cases in a twelve-year study. Urology. 1977;10(5):446–9.

60. World Health Organization, Department of Reproductive Health and Research. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. Vol. 5a. edição. 2010. 287 p.

61. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. Anal Biochem. 1985;150(1):76–85.

62. Fosang AJ, Colbran RJ. Transparency Is the Key to Quality. J Biol Chem. 11 de dezembro de 2015;290(50):29692–4.

63. Romero-Calvo I, Ocón B, Martínez-Moya P, Suárez MD, Zarzuelo A, Martínez-Augustin O, et al. Reversible Ponceau staining as a loading control alternative to actin in Western blots. Anal Biochem. 15 de junho de 2010;401(2):318–20.

64. Intasqui P, Camargo M, Antoniassi MP, Cedenho AP, Carvalho VM, Cardozo KHM, et al. Association between the seminal plasma proteome and sperm functional traits. Fertil Steril. março de 2016;105(3):617–28.

65. Camargo M, Intasqui P, Bertolla RP. Proteomic profile of seminal plasma in adolescents and adults with treated and untreated varicocele. Asian J Androl. 4 de dezembro de 2015;

66. Marenholz I, Heizmann CW, Fritz G. S100 proteins in mouse and man: from evolution to function and pathology (including an update of the nomenclature). Biochem Biophys Res Commun. 1º de outubro de 2004;322(4):1111–22.

67. Ehrchen JM, Sunderkötter C, Foell D, Vogl T, Roth J. The endogenous Toll-like receptor 4 agonist S100A8/S100A9 (calprotectin) as innate amplifier of infection, autoimmunity, and cancer. J Leukoc Biol. setembro de 2009;86(3):557–66.

68. Srikrishna G. S100A8 and S100A9: new insights into their roles in malignancy. J Innate Immun. 2012;4(1):31–40.

69. Koy M, Hambruch N, Hussen J, Pfarrer C, Seyfert H-M, Schuberth H-J. Recombinant bovine S100A8 and A9 enhance IL-1β secretion of

interferon-gamma primed monocytes. Vet Immunol Immunopathol. 15 de setembro de 2013;155(3):162–70.

70. Chen H, Xu C, Jin Q, Liu Z. S100 protein family in human cancer. Am J Cancer Res. 2014;4(2):89–115.

71. Loser K, Vogl T, Voskort M, Lueken A, Kupas V, Nacken W, et al. The Toll-like receptor 4 ligands Mrp8 and Mrp14 are crucial in the development of autoreactive CD8+ T cells. Nat Med. junho de 2010;16(6):713–7.

72. Shabani F, Farasat A, Mahdavi M, Gheibi N. Calprotectin (S100A8/S100A9): a key protein between inflammation and cancer. Inflamm Res Off J Eur Histamine Res Soc Al. outubro de 2018;67(10):801–12.

73. Yui S, Mikami M, Tsurumaki K, Yamazaki M. Growth-inhibitory and apoptosis-inducing activities of calprotectin derived from inflammatory exudate cells on normal fibroblasts: regulation by metal ions. J Leukoc Biol. janeiro de 1997;61(1):50–7.

74. Yui S, Nakatani Y, Hunter MJ, Chazin WJ, Yamazaki M. Implication of extracellular zinc exclusion by recombinant human calprotectin (MRP8 and MRP14) from target cells in its apoptosis-inducing activity. Mediators Inflamm. junho de 2002;11(3):165–72.

75. Universal Protein Resource (UniProt). Protein S100-A9 [Internet]. Disponível em: https://www.uniprot.org/uniprot/P06702

76. Lominadze G, Rane MJ, Merchant M, Cai J, Ward RA, McLeish KR. Myeloid-related protein-14 is a p38 MAPK substrate in human neutrophils. J Immunol Baltim Md 1950. 1º de junho de 2005;174(11):7257–67.

77. Vogl T, Ludwig S, Goebeler M, Strey A, Thorey IS, Reichelt R, et al. MRP8 and MRP14 control microtubule reorganization during transendothelial migration of phagocytes. Blood. 15 de dezembro de 2004;104(13):4260–8.

78. Knobill N. Physiology of Reproduction. 4th ed. Elsevier Academic Press;

79. Jia J, Arif A, Terenzi F, Willard B, Plow EF, Hazen SL, et al. Target-selective protein S-nitrosylation by sequence motif recognition. Cell. 23 de outubro de 2014;159(3):623–34.

80. Nakamura T, Lipton SA. Emerging role of protein-protein transnitrosylation in cell signaling pathways. Antioxid Redox Signal. 20 de janeiro de 2013;18(3):239–49.

81. Hess DT, Matsumoto A, Kim S-O, Marshall HE, Stamler JS. Protein S-nitrosylation: purview and parameters. Nat Rev Mol Cell Biol. fevereiro de 2005;6(2):150–66.

82. Ma L, Sun P, Zhang J-C, Zhang Q, Yao S-L. Proinflammatory effects of S100A8/A9 via TLR4 and RAGE signaling pathways in BV-2 microglial cells. Int J Mol Med. julho de 2017;40(1):31–8.

83. Taguchi A, Blood DC, del Toro G, Canet A, Lee DC, Qu W, et al. Blockade of RAGE-amphoterin signalling suppresses tumour growth and metastases. Nature. 18 de maio de 2000;405(6784):354–60.

84. Yamagishi S, Matsui T, Nakamura K. Blockade of the advanced glycation end products (AGEs) and their receptor (RAGE) system is a possible mechanism for sustained beneficial effects of multifactorial intervention on mortality in type 2 diabetes. Med Hypotheses. novembro de 2008;71(5):749–51.

85. Sturchler E, Galichet A, Weibel M, Leclerc E, Heizmann CW. Site-specific blockade of RAGE-Vd prevents amyloid-beta oligomer neurotoxicity. J Neurosci Off J Soc Neurosci. 14 de maio de 2008;28(20):5149–58.

86. Nishikawa Y, Kajiura Y, Lew JH, Kido J-I, Nagata T, Naruishi K. Calprotectin Induces IL-6 and MCP-1 Production via Toll-Like Receptor 4 Signaling in Human Gingival Fibroblasts. J Cell Physiol. julho de 2017;232(7):1862–71.

87. Vogl T, Tenbrock K, Ludwig S, Leukert N, Ehrhardt C, van Zoelen MAD, et al. Mrp8 and Mrp14 are endogenous activators of Toll-like receptor 4, promoting lethal, endotoxin-induced shock. Nat Med. setembro de 2007;13(9):1042–9.

88. Oppenheim JJ, Yang D. Alarmins: chemotactic activators of immune responses. Curr Opin Immunol. agosto de 2005;17(4):359–65.

89. Kumar N, Singh AK. Reactive Oxygen Species in Seminal Plasma as a Cause of Male Infertility. J Gynecol Obstet Hum Reprod. 16 de julho de 2018;

90. Becker RM, Darrow C, Zimonjic DB, Popescu NC, Watson MA, Fleming TP. Identification of mammaglobin B, a novel member of the uteroglobin gene family. Genomics. 15 de novembro de 1998;54(1):70–8.

91. Jackson BC, Thompson DC, Wright MW, McAndrews M, Bernard A, Nebert DW, et al. Update of the human secretoglobin (SCGB) gene superfamily and an example of “evolutionary bloom” of androgen-

binding protein genes within the mouse Scgb gene superfamily. Hum Genomics. outubro de 2011;5(6):691–702.

92. Klug J, Beier HM, Bernard A, Chilton BS, Fleming TP, Lehrer RI, et al. Uteroglobin/Clara cell 10-kDa family of proteins: nomenclature committee report. Ann N Y Acad Sci. 2000;923:348–54.

93. Mandal AK, Zhang Z, Ray R, Choi MS, Chowdhury B, Pattabiraman N, et al. Uteroglobin represses allergen-induced inflammatory response by blocking PGD2 receptor-mediated functions. J Exp Med. 17 de maio de 2004;199(10):1317–30.

94. Beato M. Binding of steroids to uteroglobin. J Steroid Biochem. maio de 1976;7(5):327–34.

95. López de Haro MS, Pérez Martínez M, García C, Nieto A. Binding of retinoids to uteroglobin. FEBS Lett. 1º de agosto de 1994;349(2):249–51.

96. Mandal AK, Ray R, Zhang Z, Chowdhury B, Pattabiraman N, Mukherjee AB. Uteroglobin inhibits prostaglandin F2alpha receptor-mediated expression of genes critical for the production of pro-inflammatory lipid mediators. J Biol Chem. 23 de setembro de 2005;280(38):32897–904.

97. Gillner M, Lund J, Cambillau C, Alexandersson M, Hurtig U, Bergman A, et al. The binding of methylsulfonyl-polychloro-biphenyls to uteroglobin. J Steroid Biochem. julho de 1988;31(1):27–33.

98. Parker M, Needham M, White R. Prostatic steroid binding protein: gene duplication and steroid binding. Nature. 1º de julho de 1982;298(5869):92–4.

99. Lea OA, Petrusz P, French FS. Prostatein. A major secretory protein of the rat ventral prostate. J Biol Chem. 10 de julho de 1979;254(13):6196–202.

100. Maccioni M, Riera CM, Rivero VE. Identification of rat prostatic steroid binding protein (PSBP) as an immunosuppressive factor. J Reprod Immunol. maio de 2001;50(2):133–49.

101. Mukherjee AB, Ulane RE, Agrawal AK. Role of uteroglobin and transglutaminase in masking the antigenicity of implanting rabbit embryos. Am J Reprod Immunol AJRI Off J Am Soc Immunol Reprod Int Coord Comm Immunol Reprod. junho de 1982;2(3):135–41.

102. Carter DB, Resnick MI. High resolution analysis of human prostatic fluid by two-dimensional electrophoresis. The Prostate. 1982;3(1):27–33.

103. Laing IA, Goldblatt J, Eber E, Hayden CM, Rye PJ, Gibson NA, et al. A polymorphism of the CC16 gene is associated with an increased risk of asthma. J Med Genet. junho de 1998;35(6):463–7.

104. Candelaria PV, Backer V, Laing IA, Porsbjerg C, Nepper-Christensen S, de Klerk N, et al. Association between asthma-related phenotypes and the CC16 A38G polymorphism in an unselected population of young adult Danes. Immunogenetics. abril de 2005;57(1–2):25–32.

105. Sengler C, Heinzmann A, Jerkic S-P, Haider A, Sommerfeld C, Niggemann B, et al. Clara cell protein 16 (CC16) gene polymorphism influences the degree of airway responsiveness in asthmatic children. J Allergy Clin Immunol. março de 2003;111(3):515–9.

106. Zehentner BK, Carter D. Mammaglobin: a candidate diagnostic marker for breast cancer. Clin Biochem. abril de 2004;37(4):249–57.

107. Zhu W, Smith JW, Huang C-M. Mass spectrometry-based label-free quantitative proteomics. J Biomed Biotechnol. 2010;2010:840518.

108. Mike May. Translating big data: The proteomics challenge. Science. 15 de junho de 2018;360(6394):1252–4.

109. Deutsch EW, Overall CM, Van Eyk JE, Baker MS, Paik Y-K, Weintraub ST, et al. Human Proteome Project Mass Spectrometry Data Interpretation Guidelines 2.1. J Proteome Res. 04 de 2016;15(11):3961–70.

110. Piehowski PD, Petyuk VA, Orton DJ, Xie F, Moore RJ, Ramirez-Restrepo M, et al. Sources of technical variability in quantitative LC-MS proteomics: human brain tissue sample analysis. J Proteome Res. 3 de maio de 2013;12(5):2128–37.

111. Keyel PA. How is inflammation initiated? Individual influences of IL-1, IL-18 and HMGB1. Cytokine. setembro de 2014;69(1):136–45.

112. Akira S. The role of IL-18 in innate immunity. Curr Opin Immunol. fevereiro de 2000;12(1):59–63.

113. Schneider BE, Korbel D, Hagens K, Koch M, Raupach B, Enders J, et al. A role for IL-18 in protective immunity against Mycobacterium tuberculosis. Eur J Immunol. fevereiro de 2010;40(2):396–405.

114. Qian L, Zhou Y, Du C, Wen J, Teng S, Teng Z. IL-18 levels in the semen of male infertility: semen analysis. Int J Biol Macromol. março de 2014;64:190–2.

115. Guarda G, So A. Regulation of inflammasome activity. Immunology. julho de 2010;130(3):329–36.

116. Dunne A. Inflammasome activation: from inflammatory disease to infection. Biochem Soc Trans. abril de 2011;39(2):669–73.

117. Zhou R, Yazdi AS, Menu P, Tschopp J. A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation. Nature. 13 de janeiro de 2011;469(7329):221–5.

118. Jorgensen I, Miao EA. Pyroptotic cell death defends against intracellular pathogens. Immunol Rev. maio de 2015;265(1):130–42.

119. Zhang X, Ibrahim E, de Rivero Vaccari JP, Lotocki G, Aballa TC, Dietrich WD, et al. Involvement of the inflammasome in abnormal semen quality of men with spinal cord injury. Fertil Steril. janeiro de 2013;99(1):118–24.

120. Monie TP. NLR activation takes a direct route. Trends Biochem Sci. março de 2013;38(3):131–9.

121. Drabovich AP, Saraon P, Jarvi K, Diamandis EP. Seminal plasma as a diagnostic fluid for male reproductive system disorders. Nat Rev Urol. maio de 2014;11(5):278–88.

122. Politch JA, Tucker L, Bowman FP, Anderson DJ. Concentrations and significance of cytokines and other immunologic factors in semen of healthy fertile men. Hum Reprod Oxf Engl. novembro de 2007;22(11):2928–35.

123. Maegawa M, Kamada M, Irahara M, Yamamoto S, Yoshikawa S, Kasai Y, et al. A repertoire of cytokines in human seminal plasma. J Reprod Immunol. março de 2002;54(1–2):33–42.

124. Cudicini C, Kercret H, Touzalin AM, Ballet F, Jégou B. Vectorial production of interleukin 1 and interleukin 6 by rat Sertoli cells cultured in a dual culture compartment system. Endocrinology. julho de 1997;138(7):2863–70.

125. Huleihel M, Lunenfeld E. Regulation of spermatogenesis by paracrine/autocrine testicular factors. Asian J Androl. setembro de 2004;6(3):259–68.

126. Matalliotakis I, Kiriakou D, Fragouli I, Sifakis S, Eliopoulos G, Koumantakis E. Interleukin-6 in seminal plasma of fertile and infertile men. Arch Androl. agosto de 1998;41(1):43–50.

127. Friebe K, Bohring C, Skrzypek J, Krause W. Levels of interleukin-6 and interleukin-8 in seminal fluid of men attending an andrological clinic. Andrologia. abril de 2003;35(2):126–9.

128. Seshadri S, Bates M, Vince G, Jones DIL. The role of cytokine expression in different subgroups of subfertile men. Am J Reprod Immunol N Y N 1989. novembro de 2009;62(5):275–82.

129. Ochsendorf FR. Infections in the male genital tract and reactive oxygen species. Hum Reprod Update. outubro de 1999;5(5):399–420.

130. Fraczek M, Szumala-Kakol A, Dworacki G, Sanocka D, Kurpisz M. In vitro reconstruction of inflammatory reaction in human semen: effect on sperm DNA fragmentation. J Reprod Immunol. novembro de 2013;100(1):76–85.

131. Camejo MI. Relation between immunosuppressive PGE(2) and IL-10 to pro-inflammatory IL-6 in seminal plasma of infertile and fertile men. Arch Androl. abril de 2003;49(2):111–6.

132. Lotti F, Maggi M. Interleukin 8 and the male genital tract. J Reprod Immunol. novembro de 2013;100(1):54–65.

133. Dziadeck W., Barkz E. Interleukin 1β and interleukin 18 and their connection with leukocytospermia in human semen. Clin Immunol. 2010;35(3):157–61.

134. Awad F, Assrawi E, Louvrier C, Jumeau C, Georgin-Lavialle S, Grateau G, et al. Inflammasome biology, molecular pathology and therapeutic implications. Pharmacol Ther. julho de 2018;187:133–49.

135. Ibrahim E, Castle SM, Aballa TC, Keane RW, de Rivero Vaccari JP, Lynne CM, et al. Neutralization of ASC improves sperm motility in men with spinal cord injury. Hum Reprod Oxf Engl. novembro de 2014;29(11):2368–73.

136. Yi Y-S. Caspase-11 non-canonical inflammasome: a critical sensor of intracellular lipopolysaccharide in macrophage-mediated inflammatory responses. Immunology. 2017;152(2):207–17.

137. Kayagaki N, Warming S, Lamkanfi M, Vande Walle L, Louie S, Dong J, et al. Non-canonical inflammasome activation targets caspase-11. Nature. 16 de outubro de 2011;479(7371):117–21.

138. Knodler LA, Crowley SM, Sham HP, Yang H, Wrande M, Ma C, et al. Noncanonical inflammasome activation of caspase-4/caspase-11 mediates epithelial defenses against enteric bacterial pathogens. Cell Host Microbe. 13 de agosto de 2014;16(2):249–56.

139. van de Veerdonk FL, Netea MG, Dinarello CA, Joosten LAB. Inflammasome activation and IL-1β and IL-18 processing during infection. Trends Immunol. março de 2011;32(3):110–6.

140. Kaplanski G. Interleukin-18: Biological properties and role in disease pathogenesis. Immunol Rev. 2018;281(1):138–53.

141. Del Giudice PT, Lima SB, Cenedeze MA, Pacheco-Silva A, Bertolla RP, Cedenho AP. Expression of the Fas-ligand gene in ejaculated sperm from adolescents with and without varicocele. J Assist Reprod Genet. fevereiro de 2010;27(2–3):103–9.

142. Fassy F, Krebs O, Rey H, Komara B, Gillard C, Capdevila C, et al. Enzymatic activity of two caspases related to interleukin-1beta-converting enzyme. Eur J Biochem. 1º de abril de 1998;253(1):76–83.

143. Gu Y, Kuida K, Tsutsui H, Ku G, Hsiao K, Fleming MA, et al. Activation of interferon-gamma inducing factor mediated by interleukin-1beta converting enzyme. Science. 10 de janeiro de 1997;275(5297):206–9.

144. Monie TP. The Canonical Inflammasome: A Macromolecular Complex Driving Inflammation. Subcell Biochem. 2017;83:43–73.

145. Gong T, Yang Y, Jin T, Jiang W, Zhou R. Orchestration of NLRP3 Inflammasome Activation by Ion Fluxes. Trends Immunol. maio de 2018;39(5):393–406.

146. Case CL, Shin S, Roy CR. Asc and Ipaf Inflammasomes direct distinct pathways for caspase-1 activation in response to Legionella pneumophila. Infect Immun. maio de 2009;77(5):1981–91.

147. Iglesias R, Locovei S, Roque A, Alberto AP, Dahl G, Spray DC, et al. P2X7 receptor-Pannexin1 complex: pharmacology and signaling. Am J Physiol Cell Physiol. setembro de 2008;295(3):C752-760.

148. Van Opdenbosch N, Van Gorp H, Verdonckt M, Saavedra PHV, de Vasconcelos NM, Gonçalves A, et al. Caspase-1 Engagement and TLR-Induced c-FLIP Expression Suppress ASC/Caspase-8-Dependent Apoptosis by Inflammasome Sensors NLRP1b and NLRC4. Cell Rep. 19 de dezembro de 2017;21(12):3427–44.

149. Hermo L, Pelletier R-M, Cyr DG, Smith CE. Surfing the wave, cycle, life history, and genes/proteins expressed by testicular germ cells. Part 1: background to spermatogenesis, spermatogonia, and spermatocytes. Microsc Res Tech. abril de 2010;73(4):241–78.

150. Dun MD, Aitken RJ, Nixon B. The role of molecular chaperones in spermatogenesis and the post-testicular maturation of mammalian spermatozoa. Hum Reprod Update. julho de 2012;18(4):420–35.

151. Beere HM. “The stress of dying”: the role of heat shock proteins in the regulation of apoptosis. J Cell Sci. 1º de junho de 2004;117(Pt 13):2641–51.

152. Bukau B, Weissman J, Horwich A. Molecular chaperones and protein quality control. Cell. 5 de maio de 2006;125(3):443–51.

153. Gething MJ, Sambrook J. Protein folding in the cell. Nature. 2 de janeiro de 1992;355(6355):33–45.

154. Van Eden W, Wick G, Albani S, Cohen I. Stress, heat shock proteins, and autoimmunity: how immune responses to heat shock proteins are to be used for the control of chronic inflammatory diseases. Ann N Y Acad Sci. outubro de 2007;1113:217–37.

155. Lachance C, Fortier M, Thimon V, Sullivan R, Bailey JL, Leclerc P. Localization of Hsp60 and Grp78 in the human testis, epididymis and mature spermatozoa. Int J Androl. fevereiro de 2010;33(1):33–44.

156. Asquith KL, Harman AJ, McLaughlin EA, Nixon B, Aitken RJ. Localization and significance of molecular chaperones, heat shock protein 1, and tumor rejection antigen gp96 in the male reproductive tract and during capacitation and acrosome reaction. Biol Reprod. fevereiro de 2005;72(2):328–37.

157. Mayer MP, Bukau B. Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism. Cell Mol Life Sci CMLS. março de 2005;62(6):670–84.

158. Lai BT, Chin NW, Stanek AE, Keh W, Lanks KW. Quantitation and intracellular localization of the 85K heat shock protein by using monoclonal and polyclonal antibodies. Mol Cell Biol. dezembro de 1984;4(12):2802–10.

159. Ecroyd H, Jones RC, Aitken RJ. Tyrosine phosphorylation of HSP-90 during mammalian sperm capacitation. Biol Reprod. dezembro de 2003;69(6):1801–7.

160. Smoyer WE, Ransom RF. Hsp27 regulates podocyte cytoskeletal changes in an in vitro model of podocyte process retraction. FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol. março de 2002;16(3):315–26.

161. Nollen EAA, Morimoto RI. Chaperoning signaling pathways: molecular chaperones as stress-sensing “heat shock” proteins. J Cell Sci. 15 de julho de 2002;115(Pt 14):2809–16.

162. Beere HM. Stressed to death: regulation of apoptotic signaling pathways by the heat shock proteins. Sci STKE Signal Transduct Knowl Environ. 31 de julho de 2001;2001(93):re1.

163. Beere HM, Wolf BB, Cain K, Mosser DD, Mahboubi A, Kuwana T, et al. Heat-shock protein 70 inhibits apoptosis by preventing recruitment of procaspase-9 to the Apaf-1 apoptosome. Nat Cell Biol. agosto de 2000;2(8):469–75.

164. Bruey JM, Ducasse C, Bonniaud P, Ravagnan L, Susin SA, Diaz-Latoud C, et al. Hsp27 negatively regulates cell death by interacting with cytochrome c. Nat Cell Biol. setembro de 2000;2(9):645–52.

165. Pratt WB, Toft DO. Regulation of signaling protein function and trafficking by the hsp90/hsp70-based chaperone machinery. Exp Biol Med Maywood NJ. fevereiro de 2003;228(2):111–33.

166. Shiau AK, Harris SF, Southworth DR, Agard DA. Structural Analysis of E. coli hsp90 reveals dramatic nucleotide-dependent conformational rearrangements. Cell. 20 de outubro de 2006;127(2):329–40.

167. Mickler M, Hessling M, Ratzke C, Buchner J, Hugel T. The large conformational changes of Hsp90 are only weakly coupled to ATP hydrolysis. Nat Struct Mol Biol. março de 2009;16(3):281–6.

168. Grad I, Cederroth CR, Walicki J, Grey C, Barluenga S, Winssinger N, et al. The molecular chaperone Hsp90α is required for meiotic progression of spermatocytes beyond pachytene in the mouse. PloS One. 31 de dezembro de 2010;5(12):e15770.

169. O'Rand MG, Richardson RT, Zimmerman LJ, Widgren EE. Sequence and localization of human NASP: conservation of a Xenopus histone-binding protein. Dev Biol. novembro de 1992;154(1):37–44.

170. Parte PP, Rao P, Redij S, Lobo V, D'Souza SJ, Gajbhiye R, et al. Sperm phosphoproteome profiling by ultra performance liquid chromatography followed by data independent analysis (LC-MS(E)) reveals altered proteomic signatures in asthenozoospermia. J Proteomics. 22 de outubro de 2012;75(18):5861–71.

171. Amaral A, Paiva C, Attardo Parrinello C, Estanyol JM, Ballescà JL, Ramalho-Santos J, et al. Identification of proteins involved in human sperm motility using high-throughput differential proteomics. J Proteome Res. 5 de dezembro de 2014;13(12):5670–84.

172. Siva AB, Kameshwari DB, Singh V, Pavani K, Sundaram CS, Rangaraj N, et al. Proteomics-based study on asthenozoospermia:

differential expression of proteasome alpha complex. Mol Hum Reprod. julho de 2010;16(7):452–62.

173. Sagare-Patil V, Bhilawadikar R, Galvankar M, Zaveri K, Hinduja I, Modi D. Progesterone requires heat shock protein 90 (HSP90) in human sperm to regulate motility and acrosome reaction. J Assist Reprod Genet. abril de 2017;34(4):495–503.

174. Ho H-C, Suarez SS. Characterization of the intracellular calcium store at the base of the sperm flagellum that regulates hyperactivated motility. Biol Reprod. maio de 2003;68(5):1590–6.

175. Li K, Xue Y, Chen A, Jiang Y, Xie H, Shi Q, et al. Heat shock protein 90 has roles in intracellular calcium homeostasis, protein tyrosine phosphorylation regulation, and progesterone-responsive sperm function in human sperm. PloS One. 2014;9(12):e115841.

176. Graner MW. HSP90 and Immune Modulation in Cancer. Adv Cancer Res. 2016;129:191–224.

177. Abul K. Abbas, Andrew H. Lichman, Shiv Pillai. Imunologia celular e molecular. 8ª. 2015.

178. Graner MW, Bigner DD. Therapeutic aspects of chaperones/heat-shock proteins in neuro-oncology. Expert Rev Anticancer Ther. maio de 2006;6(5):679–95.

179. Erkeller-Yüksel FM, Isenberg DA, Dhillon VB, Latchman DS, Lydyard PM. Surface expression of heat shock protein 90 by blood mononuclear cells from patients with systemic lupus erythematosus. J Autoimmun. dezembro de 1992;5(6):803–14.

180. Ferrarini M, Heltai S, Zocchi MR, Rugarli C. Unusual expression and localization of heat-shock proteins in human tumor cells. Int J Cancer. 19 de junho de 1992;51(4):613–9.

181. Cid C, Regidor I, Poveda PD, Alcazar A. Expression of heat shock protein 90 at the cell surface in human neuroblastoma cells. Cell Stress Chaperones. maio de 2009;14(3):321–7.

182. Zeng Y, Feng H, Graner MW, Katsanis E. Tumor-derived, chaperone-rich cell lysate activates dendritic cells and elicits potent antitumor immunity. Blood. 1º de junho de 2003;101(11):4485–91.

183. Dubaniewicz A. Microbial and human heat shock proteins as “danger signals” in sarcoidosis. Hum Immunol. dezembro de 2013;74(12):1550–8.

184. Hu Z, Yang XY, Liu Y, Morse MA, Lyerly HK, Clay TM, et al. Release of endogenous danger signals from HIFU-treated tumor cells and their stimulatory effects on APCs. Biochem Biophys Res Commun. 16 de setembro de 2005;335(1):124–31.

185. Oura J, Tamura Y, Kamiguchi K, Kutomi G, Sahara H, Torigoe T, et al. Extracellular heat shock protein 90 plays a role in translocating chaperoned antigen from endosome to proteasome for generating antigenic peptide to be cross-presented by dendritic cells. Int Immunol. abril de 2011;23(4):223–37.

186. Yokota S, Fujii N. Immunomodulatory activity of extracellular heat shock proteins and their autoantibodies. Microbiol Immunol. maio de 2010;54(5):299–307.

187. Gross C, Schmidt-Wolf IGH, Nagaraj S, Gastpar R, Ellwart J, Kunz-Schughart LA, et al. Heat shock protein 70-reactivity is associated with increased cell surface density of CD94/CD56 on primary natural killer cells. Cell Stress Chaperones. 2003;8(4):348–60.

188. Mbofung RM, McKenzie JA, Malu S, Zhang M, Peng W, Liu C, et al. HSP90 inhibition enhances cancer immunotherapy by upregulating interferon response genes. Nat Commun. 06 de 2017;8(1):451.

189. Campanella C, Bavisotto C, Gammazza A, Nikolic D, Rappa F, David S, et al. Exosomal Heat Shock Proteins as New Players in Tumour Cell-to-Cell Communication. J Circ Biomark. 2014;

190. Yang C, Guo W-B, Zhang W-S, Bian J, Yang J-K, Zhou Q-Z, et al. Comprehensive proteomics analysis of exosomes derived from human seminal plasma. Andrology. setembro de 2017;5(5):1007–15.

191. Poliakov A, Spilman M, Dokland T, Amling CL, Mobley JA. Structural heterogeneity and protein composition of exosome-like vesicles (prostasomes) in human semen. The Prostate. 1º de fevereiro de 2009;69(2):159–67.

192. Belardin LB, Del Giudice PT, Camargo M, Intasqui P, Antoniassi MP, Bertolla RP, et al. Alterations in the proliferative/apoptotic equilibrium in semen of adolescents with varicocele. J Assist Reprod Genet. dezembro de 2016;33(12):1657–64.

BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

Universidade Federal de São Paulo, Escola Paulista de Medicina, Biblioteca Central – Antônio Rubino de Azevedo. Normas para teses e dissertações. 2014.