Luana Nayara Gallego Adami

O EFEITO DO TRATAMENTO COM CARNOSINA DURANTE O PROCESSAMENTO SEMINAL DE AMOTRAS HUMANAS POR GRADIENTE DE DENSIDADE DESCONTÍNUO

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

SÃO PAULO

2018

Luana Nayara Gallego Adami

O EFEITO DO TRATAMENTO COM CARNOSINA DURANTE O PROCESSAMENTO SEMINAL DE AMOTRAS HUMANAS POR GRADIENTE DE DENSIDADE DESCONTÍNUO

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

Orientador:

Prof. Dr. Marcilio Nichi

Coorientador:

Prof. Dr. Ricardo Pimenta Bertolla.

SÃO PAULO

2018

Adami, Luana Nayara Gallego.

O efeito do tratamento com carnosina durante o processamento seminal de amostras humanas por gradiente de densidade descontínuo. / Luana Nayara Gallego Adami. – São Paulo, 2018.

xvi, 64f.

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

Título em inglês: The effect of treatment with carnosine during human seminal process by discontinuous density gradient.

1.Estresse oxidativo. 2.Antioxidantes. 3.Espermatozoides. 4.Mitocôndrias. 5.Radicais livres

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO

ESCOLA PAULISTA DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE CIRURGIA

DISCIPLINA DE UROLOGIA

Chefe do Departamento: Prof. Dr. José Luiz Martins

Chefe da Disciplina: Prof. Dr. Agnaldo Pereira Cedenho

Coordenador do Curso de Pós-graduação: Prof. Dr. Ricardo Pimenta Bertolla

Dedicatória

Aos meus pais **Aparecida Fátima Gallego Adami** e **José Claudio Adami** por tantos anos de dedicação, confiança, valores, incentivos e amor; assim como ao meu irmão **Leandro Gallego Adami**, por sempre me apoiar dando força e acreditando no meu potencial. De maneira geral aos meus avós e à toda minha família, que mesmo sem compreender por completo, esboçam tremendo orgulho de mim.

Ao **Estevão Carlos Lima** que esteve todo tempo ao meu lado durante minha vida acadêmica e me ajudou a tomar decisões, evoluir, assim como me proporcionou momentos felizes que me fizeram amadurecer e crescer.

À todas as mulheres que buscam o conhecimento, assim como reconhecimento em suas áreas de atuação profissional, inclusive na área científica e acadêmica onde ainda existe muito preconceito sexista. Lembrando sempre que pós graduação no Brasil é um sonho alcançado pela minoria.

À todos mestres que fizeram parte da minha evolução como aluna e aprendiz, ensinando, mostrando, fazendo com que eu aprendesse a tentar ser cada vez mais científica, agindo de forma sempre ética; e em principal aos Prof. Dr. Marcilio Nichi pela confiança depositada em mim e sua imensa sabedoria científica, e Prof. Dr. Ricardo Pimenta Bertolla que ao me permitir uma oportunidade de trabalho em seu grupo, fez despertar minha veia científica e querer desbravar a ciência.

Agradecimentos

Ao **Prof. Dr. Agnaldo Pereira Cedenho**, por conceder uma oportunidade de fazer minha pós-graduação no Programa de Pós-graduação em Urologia da UNIFESP.

Ao **Prof. Dr. Marcilio Nichi** por aceitar ser meu orientador, me guiando na escolha da melhor hipótese a ser estudada, me apoiando em minhas escolhas, sendo solícito e disponível sempre quando foi necessário.

Ao **Prof. Dr. Ricardo Pimenta Bertolla**, pela coorientação, presença e ajuda na realização de todo o meu mestrado, assim como todo o incentivo e ensinamentos que foi dado nesses anos de convivência.

Ao **Dr. Daniel Suslik Zylbersztejn** e ao **Dr. Renato Fraietta** pela participação no recrutamento e avaliação dos voluntários incluídos nesse estudo. Assim como todos outros professores e orientadores do Programa que sempre tiveram algo a me ensinar.

Aos profissionais do Laboratório de Andrologia da UNIFESP, **Danielle Spínola Tibaldi, Valéria Barradas, Carolina Homsi e Raimundo Gonçalves Moreira**, por sempre terem colaborado na análise seminal de todas as amostras.

À **Camila Teixeira** por toda a paciência e eficiência na secretaria da disciplina da qual faço parte.

Às pós-graduandas **Bruna Tuani de Lima e Rhayza Roberta Andretta** por me ajudarem em todo o processo de padronização inicial da citometria, assim como nos pensamentos que proporcionaram durante o desenvolvimento do projeto, além de sempre serem solícitas, disponíveis e amigas no ambiente de trabalho.

Às pós-graduandas **Dóris Ferreira Moriyama, Renata Carvalho, Jéssica Timóteo Jeremias e Fátima Kazue Okada** por todo o aprendizado e anos de companheirismo e amizade.

Aos demais pós-graduandos e graduandos **Mariana Antoniassi, Paula Intasqui Lopes, Maria Beatriz Ribeiro de Andrade, Larissa Berloffa Berladin, Jheysson Alfredo Cordeiro de Moura, Rodrigo Cury Fogagnolo, Glaucia Caroline Piazza Ribeiro, Jeanne Pereira dos Santos e Mariana Camargo** que de alguma maneira, colaboraram para meu aprendizado e a realização deste trabalho.

Aos amigos que a graduação e a pós-graduação trouxeram, que de alguma maneira me proporcionaram incentivos e momentos agradáveis de lazer. **Bruna Tuani**

de Lima, Letícia Bezerra Faria e Letícia Aiko que participaram arduamente dessa etapa de crescimento profissional com amizade, tolerância e afeto, presentes em todos os momentos.

Ao **Estevão Carlos Lima** por ser a quem eu também me inspiro como profissional, cientista e amante das descobertas, além de todo o companheirismo, carinho, atenção e apoio.

À todos pacientes e voluntários que aceitaram participar deste trabalho.

À toda minha família que sempre me apoiou e permitiu que eu me dedicasse à esse projeto de vida.

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)** pelo auxílio financeiro em forma de bolsa de Mestrado (processo nº:2016/13822-7), sem a qual não seria possível a realização desse estudo.

Sumário

Dedicatória.....iv
Agradecimentos.....v
Lista de figuras.....x
Lista de quadros, tabelas e gráficos.....xi
Lista de abreviaturas, símbolos e siglas.....xii
Resumo.....xiii
Abstract.....xv

1. INTRODUÇÃO.....01
2. HIPÓTESE.....07
3. OBJETIVO.....08
4. MATERIAL E MÉTODO.....09
4.1. Coleta de amostras.....09
4.1.1. Pacientes.....09
4.1.2. Espermograma.....09
4.2. Processamento seminal.....10
4.2.1. Estudo piloto força de centrifugação.....10
4.3. Diluição carnosina.....10
4.4. Citometria de fluxo.....11
4.4.1. Padronização da citometria.....11
4.4.2. Potencial de membrana mitocondrial.....12
4.4.3. Produção de ânions superóxido.....13
4.5. Análises funcional dos espermatozoides.....14
4.5.1. Fragmentação de DNA.....14
4.5.2. Integridade do acrossoma.....15
4.5.3. Atividade mitocondrial.....16
4.6. Análise da integridade de membrana plasmática.....17
4.7. Motilidade espermática.....18
4.8. Análise estatística.....18
5. RESULTADOS.....19
5.1. Cálculo amostral.....19
5.2. Citometria de fluxo.....20

5.3. Análise funcional dos espermatozoides e integridade de membrana plasmática.....20
5.4. Análise da motilidade espermática.....23
6. DISCUSSÃO.....25
7. CONCLUSÃO.....32
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....33
9. ANEXOS

Lista de Figuras

Figura 1. Representação da redução do oxigênio por adição de um elétron a cada etapa. O ânion superóxido inicialmente formado, pode ser convertido em peróxido de hidrogênio, que por sua vez, pode ser convertido em radical hidroxila, um dos radicais mais deletérios.....02

Figura 2. As reações de Fenton e Haber-Weiss para formação de radical tóxico.....03

Figura 3. Principais vias de detoxificação de aldeídos.....05

Figura 4. Carnosina como captadora do radical hidroxila.....06

Figura 5. Fotomicrografia com magnificação de 400x representativa da fragmentação do DNA pelo método Ensaio Cometa alcalino com presença da cauda de DNA espermático fragmentado, sendo possível a classificação de I a IV de acordo com a intensidade de fragmentação.....15

Figura 6. Fotomicrografia com magnificação de 1000x representativa da integridade da membrana acrossomal pelo método de coloração PNA com células com acrossoma íntegro e células sem integridade acrossomal, respectivamente.....16

Figura 7. Fotomicrografia com magnificação de 1000x representativa da avaliação da atividade mitocondrial pelo método de coloração DAB com células classificadas de I à IV.....17

Figura 8. Fotomicrografia com magnificação de 1000x representativa da vitalidade espermática pelo método de coloração Eosina/Nigrosina, onde os espermatozoides corados em rosa possuem sua membrana fragmentada e estão mortos, e os espermatozoides brancos possuem integridade de membrana, portanto vivos.....17

Figura 9. Representação da glicólise para a produção energética pela mitocôndria, contendo as fases preparatória (gasto de 2 ATPs) e compensatória (produção de 4ATPs e 2NADH+).....26

Lista de Quadros, Tabelas e Gráficos

Quadro 1. Siglas, características do movimentos espermático e seus respectivos significados.....18
Tabela 1. Cálculo amostral.....19
Tabela 2. Resultados de análises em citometria de fluxo dos espermatozoides para produção de ânion superóxido e potencial de membrana mitocondrial nos grupos controle (0), antioxidante 1 (20mM) e antioxidante 2 (50mM).....20
Tabela 3. Resultados de análises funcionais dos espermatozoides e vitalidade espermática nos grupos controle (0), antioxidante 1 (20mM), antioxidante 2 (50mM).....21
Tabela 4. Análise da motilidade espermática por meio do Sistema Computadorizado da Motilidade (CASA - Computer Assisted Sperm Aanalysis) antes e após do gradiente de densidade descontínuo com os grupos controle (0), antioxidante 1 (20mM), antioxidante 2 (50mM).....23
Gráfico 1. Gráficos Dot Plot representando a separação das populações de células com alto e baixo potencial de membrana mitocondrial. Gráfico A com a maioria das células com alto potencial e B com maior quantidade de células com baixo potencial, que receberam tratamento com camptotecina, como controle negativo.....12
Gráfico 2. Gráfico Dot Plot FL1-FL2 representando as populações de espermatozoides com alto e baixo potencial de membrana mitocondrial.....13
Gráfico 3. Gráfico de picos Count-FL2 representando as populações de espermatozoide com ausência e presença do ânion superóxido, respectivamente....14
Gráfico 4. Gráfico representativo das médias de DAB classe I, onde houve diferença estatisticamente significante (entre os grupos 0 e 50mM).....22

Lista de Abreviaturas, Símbolos e Siglas

AGPIs. Ácidos graxos poli-insaturados

ALH. Amplitude do movimento lateral da cabeça

BCF. Frequência de batimento cruzado

°C. grau Celsius

DAB. 3,3'diaminobenzidina

DHE. Dihidroetídio

DP. Desvio padrão

EO. Estresse oxidativo

EROs. Espécies reativas de oxigênio

Fapesp. Fundação de Amparo à pesquisa do Estado de São Paulo

GLM. General Linear Model

HTF. Human Tubal Fluid

IC 95 %. Intervalo de confiança de 95% da média

IR. Intervalo interquartil

JC1. Iodeto de 5,5',6,6'-tetracloro1,1'3,3'-tetrametilbenzimidazolilcarcocianina

Kg. Quilograma

LIN. Linearidade

mM. Milimolar

nm. nanômetro

OMS. Organização Mundial da Saúde

PNA. *Peanut agglutinin*

Q1-Q3. Primeiro e o terceiro quartil, respectivamente

STR. Retilinearidade

Unifesp. Universidade Federal de São Paulo

VAP. Velocidade média de percurso

VCL. Velocidade curvilínea

VSL. Velocidade retilínea

xG. Força centrífuga rotacional, em gravidades

Resumo

Introdução: A infertilidade masculina pode ser causada pelo estresse oxidativo seminal que leva prejuízos aos espermatozoides. Entretanto, o plasma seminal possui mecanismos antioxidantes para tentar neutralizar esses danos celulares. Por outro lado, as biotécnicas utilizadas durante o processamento seminal tendem a diminuir essa proteção antioxidante aumentando os danos oxidativos ao gameta. Na tentativa de minimizar os danos, antioxidantes exógenos são suplementados nos sistemas *in vitro*. A carnosina, reportada por sua potente função antioxidante, tem capacidade de reagir com produtos responsáveis por provocar danos celulares. Dessa forma suplementar carnosina nos meios de processamento seminal levaria a uma melhora na qualidade funcional dos espermatozoides**. Objetivo**: Avaliar o efeito de diferentes concentrações da carnosina no processamento das amostras seminais. **Método:** As amostras seminais (n=34) foram divididas em 3 grupos e seguiram para o processamento seminal: grupo controle sem suplementação com a carnosina (0) recebeu as camadas de gradiente de densidade descontínua – Percoll (80% e 40%) e a amostra; o grupo 20 mM, por sua vez, teve as camadas de Percoll suplementadas com 20 mM de carnosina; finalmente, o grupo 50mM teve as camadas de Percoll suplementadas com 50 mM de carnosina. As amostras passaram pelo processo de gradiente de densidade descontínuo por 20 minutos a 600xG e foram lavadas com meio de cultura fluido tubário humano (HTF) por 10 minutos a 600xG. Após o processamento, os espermatozoides foram avaliados quanto ao potencial de membrana mitocondrial, à produção de ânion superóxido intracelular, à fragmentação de DNA espermático, à integridade acrossômica, à atividade mitocondrial, à integridade de membrana plasmática e à motilidade espermática. Para analisar a normalidade e esfericidade dos dados, utilizamos os testes de Kolmogorov-Smirnov e de Mauchly respectivamente, e então o General Linear Model (GLM) com teste *post-hoc* de Sidak. Para as variáveis não normais foi utilizado o teste não paramétrico de Friedman com *post-hoc* de Games-Howell, considerando α = 5% e utilizando o programa SPSS21. **Resultados**: A suplementação com a carnosina na concentração de 50 mM levou à melhora da atividade mitocondrial dos espermatozoides quando comparado ao grupo controle. Para variáveis como % de espermatozoides móveis e % de espermatozoides progressivos, velocidade média de percurso, retilínea e

curvilínea, e linearidade dos espermatozoides houve uma melhora nos índices após o gradiente de densidade descontínuo, entretanto as concentrações de carnosina não foram efetivas. Já para a frequência de batimento dos flagelos a presença de carnosina em ambas concentrações elevou as frequências quando comparadas à amostra antes do gradiente de densidade descontínuo. **Conclusão:** A suplementação da carnosina nas amostras seminais humanas pode apresentar efeito benéfico para a atividade mitocondrial espermática e a frequência de batimento cruzado, amenizando os possíveis danos provocados pelo processamento seminal.

Palavras-chave: Estresse oxidativo, Antioxidantes, Espermatozoides, Mitocôndrias, Radicais livres.

Abstract

Introduction: Male infertility can be caused by seminal oxidative stress that lead to sperm damages. However, seminal plasma contains antioxidants mechanisms responsible for avoiding these cellular damages. On the other hand, biotechniques used during seminal processing tend to decrease such antioxidant protection. In an attempt to minimize damage, exogenous antioxidants are supplemented in *in vitro* systems. Carnosine, previously reported for its potent antioxidant function, has the ability to react with products responsible for causing cellular damage. Thus, supplementing carnosine in the medium of seminal processing would lead to an improvement on sperm functional quality. **Objective**: To evaluate the effect of different concentrations of carnosine during human seminal process. **Method:** The seminal sample from 34 patients were divided into 3 groups and followed to seminal process: control group without carnosine supplementation (0) received two layers of discontinuous density gradient – Percoll (80% e 40%) and sample; the 20Mm group, received the layers of Percoll supplemented with 20 mM of carnosina; and, the 50mM group had the layers of Percoll supplemented with 50 mM of carnosine. The sample passed by discontinuous density gradient for 20 minutes at 600xG and washed with human tubal fluid medium (HTF) for 10 minutes at 600 xG. After that, the spermatozoa were evaluated according to mitochondrial membrane potential, intracellular superoxide anion production, sperm DNA fragmentation, acrosome integrity, mitochondrial activity, plasma membrane integrity, and motility. Analyzing the data normality and sphericity, we used the Kolmogorov-Smirnov test and Mauchly test respectively, so we also used General Linear Model (GLM) with Sidak *post-hoc* test. To not normal data we used nonparametric Friedman test with Games-Howell *post-hoc* test considering α = 5% and using the SPSS21 software. **Results**: The carnosine supplementation with 50 mM lead to improve of sperm mitochondrial activity when compared to control group. Variable such as % of sperm motile, % sperm progressive, VAP, VSL, VCL and LIN showed an improvement after the discontinuous density gradient, however the carnosine concentrations wasn't effectives. To BCF, the both concentration of carnosine increased the frequency when compared to samples before discontinuous density gradient. **Conclusion:** The carnosine supplementation in

seminal samples can show benefit effect to sperm mitochondrial activity and beat cross frequency, decreasing possible damages caused by seminal processing.

Key-words: Oxidative stress, Antioxidants, Spermatozoa, Mitochondria, Free radicals.

1. INTRODUÇÃO

Infertilidade é uma definição dada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) ao casal que não consegue uma gravidez de sucesso, após um ano de tentativas, sem utilização de métodos contraceptivos (1). Cerca de 15% dos casais em idade reprodutiva são acometidos pela infertilidade, sendo o fator masculino responsável por cerca de 50% desses casos (1–3) Uma das causas de infertilidade masculina que merece destaque é o estresse oxidativo que prejudica o gameta masculino, acometendo 40% dos homens inférteis (4).

O estresse oxidativo seminal ocorre quando há um desbalanço entre a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e os mecanismos antioxidantes presentes (5,6). Este desbalanço pode levar a danos em todas estruturas biológicas como DNA, RNA, proteínas e também ao prejuízo de ácidos graxos poli-insaturados (AGPIs) presentes na membrana plasmática do espermatozoide (9) os quais proporcionam fluidez, essencial durante o processo de fertilização (10). Além disso, por possuir um citoplasma bastante reduzido, o que limita a proteção antioxidante enzimática intracelular, o espermatozoide é extremamente vulnerável ao estresse oxidativo (12).

Somado a isso, as aplicações da biotecnologia em técnicas de reprodução assistida, como centrifugação e criopreservação do sêmen, podem ainda aumentar os danos oxidativos (13–15). Uma das técnicas utilizadas para a seleção de espermatozoides viáveis para posterior aplicação de técnicas de fertilização é o gradiente de densidade descontínuo com o Percoll, comumente utilizado em pesquisas. Esse procedimento recomendado utiliza uma centrifugação do sêmen juntamente à um gradiente de densidade descontínuo em que os espermatozoides potencialmente funcionais devem ser separados do plasma seminal, de espermatozoides mortos e amorfos, leucócitos e debris, de forma eficiente e rápida. A presença de plasma seminal em sistemas de fertilizações *in vitro* inibe a reação acrossômica e diminui a capacidade de fertilização dos espermatozoides (1,12). Além disso, se sabe que nesse método de seleção por meio de centrifugações, o espermatozoide se torna bastante susceptível à prejuízos celulares devido a excessiva produção de EROs que é desencadeado por conta do tempo e da força de

centrifugação utilizados nesse método (16), permitindo vulnerabilidade ao espermatozoide como por exemplo danos ao acrossoma e à mitocôndria.

As EROs são, em sua maioria, radicais livres com grande reatividade por possuírem elétrons despareados, sendo normalmente produzidas pelo metabolismo aeróbico. A figura 1 representa a cascata de reações de adição de elétrons às espécies reativas de oxigênio.

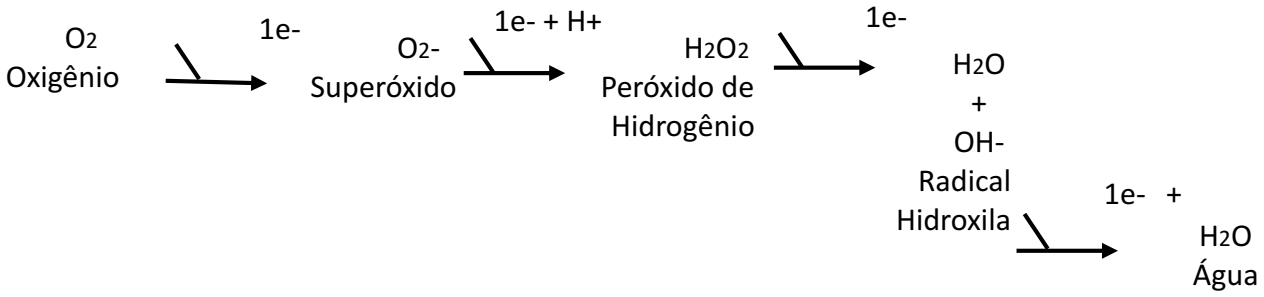


Figura 1: Representação da redução do oxigênio por adição de um elétron a cada etapa. O ânion superóxido inicialmente formado, pode ser convertido em peróxido de hidrogênio, que por sua vez, pode ser convertido em radical hidroxila, um dos radicais mais deletérios.

O ânion superóxido, formado inicialmente, é convertido em peróxido de hidrogênio e na presença de metais de transição ocorre a formação do radical hidroxila, por meio da reação de Fenton e Haber-Weiss (figura 2) (17). O radical hidroxila é potencialmente a espécie mais deletéria por estar envolvido com o processo de peroxidação lipídica e consequente produção de subprodutos ainda mais perigosos (17).

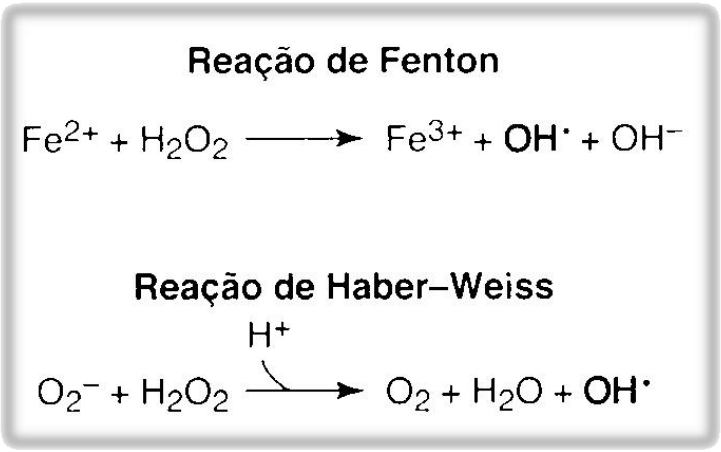


Figura 2: As reações de Fenton e Haber-Weiss para formação de radical hidroxila tóxico.

A peroxidação lipídica é um fenômeno que envolve a oxidação dos lipídeos insaturados de membrana celular em decorrência da ação do estresse oxidativo (18). Esse processo gera um produto denominado malondialdeído (MDA), um agente alquilante, podendo ser um produto com maior potencial deletério por possuir uma meia vida mais longa que as demais EROs. Por ser uma substância mais estável, é mutagênico e capaz de se ligar covalentemente aos nucleotídeos do DNA, peptídeos e proteínas alterando as suas funções moleculares e induzindo a quebra na dupla fita de DNA (19,20). Então, por meio da peroxidação lipídica, a membrana celular do espermatozoide pode sofrer prejuízos como o aumento de sua permeabilidade, provocando uma redução na integridade acrossômica, em sua atividade mitocondrial, assim como um aumento na fragmentação de DNA do espermatozoide (11,21).

Para tentar minimizar possíveis danos celulares ao espermatozoide, o plasma seminal possui um mecanismo antioxidante com a capacidade de neutralizar as EROs presente. No entanto, durante grande parte das biotécnicas de reprodução, o plasma seminal é removido. Com isso, estudos têm demonstrado a importância da manutenção desse equilíbrio, haja vista a existência de casos em que pacientes com infertilidade idiopática apresentaram altos níveis de EROs, sugerindo que essa seja, direta ou indiretamente, a possível causa dessa infertilidade (20).

A adição de antioxidantes exógenos tem sido uma maneira de tentar minimizar os danos que o excesso de EROs causam em amostras seminais, tanto em suplementação oral quanto *in vitro*. Trabalhos do nosso grupo mostraram que houve

melhora na integridade acrossômica dos espermatozoides e na atividade mitocondrial quando as amostras induzidas ao EO com peróxido de hidrogênio foram suplementadas *in vitro* com o antioxidante vitamina E (alfa-tocoferol), assim como outros grupos analisaram a melhora tanto na motilidade quanto na viabilidade dos espermatozoides, utilizando também antioxidantes (19,22,23).

Em 1998, Ciara M. Hughes e colaboradores mostraram que a suplementação das amostras seminais humanas com vitamina E, urato e ácido ascórbico, durante o processamento seminal por meio do gradiente de densidade descontínuo, Percoll, levaram a uma melhora na integridade do DNA dos espermatozoides, indicando que o processo, apesar de selecionar espermatozoides móveis, pode ser deletério (15). Assim como, Griveau e Lannou mostraram aspectos positivos da utilização de antioxidantes nas técnicas de processamento seminal, tanto gradiente de densidade descontínuo quanto a técnica de swim-up (24), contra os danos da peroxidação lipídica.

Para amostras submetidas ao congelamento, o processamento seminal também é fundamental na seleção dos espermatozoides móveis para posterior utilização em técnicas de fertilização *in vitro*. O gradiente de densidade descontínuo de Percoll, utilizado junto com suplementação de 2-deoxiadenosina e pentoxifillina levou à uma melhora na motilidade espermática (25). Adicionalmente, a suplementação *in vitro* com alfa-tocoferol em amostras suínas levou a uma diminuição da peroxidação lipídica após o processamento seminal por meio de Percoll e da coluna de filtração Sephadex, melhorando a qualidade seminal pós congelamento (14).

A literatura mostra diversas suplementações com alguns antioxidantes que estão presentes no plasma seminal e que possuem fundamental função na manutenção do equilíbrio EROs/antioxidantes. A Carnosina, também conhecida como beta-alanil histidina é um dipeptídeo composto de histidina e beta alanina descoberta em 1990 pelo russo Gulewitsch (26). Suplementar a dieta com carnosina leva à um aumento em até 80% de sua concentração nos músculos, pois diminui a quantidade de cálcio necessária para a contração muscular e melhora o desempenho dos músculos esqueléticos de atletas, diminuindo o estresse pós-treino (27–29), além de atuar como quelante de metais (30,31).

A carnosina é encontrada nos músculos, cérebro, fígado, rins e outros tecidos tendo importante e potente função antioxidante (32). Ela tem sido reportada como neuroprotetor (33,34) e envolvida na prevenção do glaucoma (35), na função antienvelhecimento (36), na função cognitiva (37) e na proteção contra doenças neuronais, como o Alzheimer (38), corroborando com outros autores que mostraram que a suplementação de 20 a 30 mM de carnosina em cultura de fibroblastos aumenta o tempo de vida dessas células em até 12 vezes (39).

Outra importância biológica da carnosina tem sido apontada em trabalhos recentes, como a capacidade de reagir com aldeídos reativos (figura 3), em especial os alfa e beta insaturados (40–42), como acroleína, 4hidroxi-2-hexenal (HHE), 4hidroxi-2-nonenal (HNE) e principalmente o malondialdeído. Nesse sentido, essa reação ocorreria por meio de “mecanismos sacrifícios” onde reagiria com aldeído (43) evitando danos a nível de lipídeos, proteínas e DNA, e assim levando à facilitação da detoxificação desses produtos (44–47).

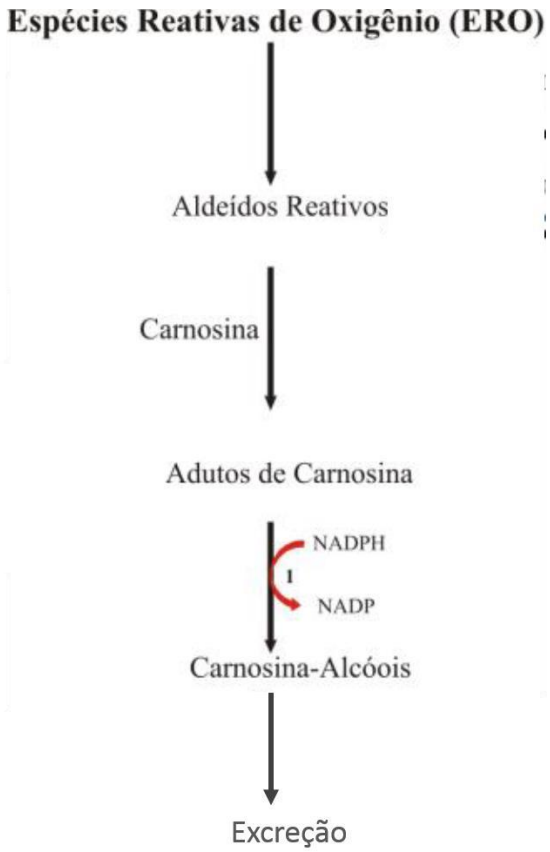
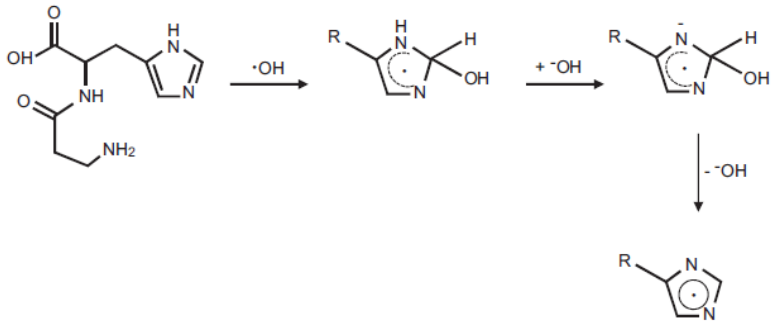


Figura 3: Principais vias de detoxificação de aldeídos (26).

Além disso, diferentemente das vitaminas, por exemplo, que atuam também como antioxidantes, a carnosina, por combater o subproduto MDA, não interfere nas cadeias fisiológicas de processos como a fertilização. Apesar da carnosina apresentar forte atração pelo radical hidroxila (OH-) se unindo a ele e neutralizando-o (figura 4) (38), não tem se observado, na literatura, trabalhos específicos com suplementação de carnosina em amostras seminal humanas. Baseado em sua fisiologia e na busca pelo novo, esse estudo propôs sua suplementação em amostras seminais humanas.



4: Carnosina como captadora do radical hidroxila.

Assim, tendo a importância já consolidada da presença de EROs e de antioxidantes no ambiente seminal e sabendo da importância do processamento seminal, mas também do estresse que ele pode provocar ao espermatozoide, é interessante que sigamos com estudos para testar modos de evitar os danos ao espermatozoide melhorando sua qualidade.

2. HIPÓTESE

Dessa forma, hipotetizamos que a suplementação *in vitro* com carnosina, nos meios de processamento seminal por gradiente de densidade descontínuo de Percoll, leva a uma melhora na qualidade funcional dos espermatozoides pós-centrifugação, protegendo-os contra danos oxidativos.

3. OBJETIVO

O presente estudo teve como objetivo suplementar com antioxidante exógeno carnosina, em duas concentrações distintas, as amostras seminais humanas submetidas ao processamento seminal por gradiente de densidade descontínuo de Percoll, avaliando seu efeito em relação a:

- potencial de membrana mitocondrial espermática
- presença do ânion superóxido intracelular
- fragmentação do DNA espermático
- integridade acrossômica
- atividade mitocondrial espermática
- integridade de membrana plasmática
- motilidade espermática.

4. MATERIAL E MÉTODO

4.1. Coleta de amostras

4.1.1. Pacientes

Em um estudo transversal, dentre as 40 amostras seminais coletadas, foram incluídas nesse estudo 34 amostras de pacientes do sexo masculino entre 21 e 47 anos, encaminhados ao Laboratório de Andrologia do Setor de Reprodução Humana da Disciplina de Urologia, Departamento de Cirurgia, da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP) para realização de exames de rotina, procedimentos de reprodução assistida, assim como homens que se apresentaram como voluntários de pesquisa. As seis amostras não inclusas neste trabalho foram excluídas devido ao fator de exclusão morfologia seminal normal. As amostras seminais foram obtidas por meio de masturbação coletadas em frascos de polipropileno estéril e descartável (Pleion, Brasil), de um lote previamente testado quanto à toxicidade do plástico para a motilidade espermática, após uma abstinência ejaculatória de 2 a 7 dias. Todos os pacientes possuíam concentração seminal ≥15 milhões de espermatozoides/mL, como preconizado pela OMS de 2010 para um sêmen considerado normal. Uma alíquota da amostra seminal coletada foi submetida ao espermograma, sendo o restante submetido ao processamento seminal com suplementações para futura análise funcional dos espermatozoides. Foram excluídos desse estudo os pacientes azoospérmicos, com criptorquidia, com morfologia < 4%, com motilidade progressiva <32%, com volume seminal ≤ 1,5mL, com índice de massa corpórea (IMC) ≥ 35 Kg/m^2, que relataram febre nos 90 dias antecedentes ao exame clínico, que passaram por tratamento com rádio e/ou quimioterapia e por cirurgia urogenital. As coletas foram realizadas após assinatura do Termo de Consentimento e Livre Esclarecimento (Anexo 1) pelos pacientes, assim como a aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo (Anexo 2).

4.1.2. Espermograma

A análise seminal foi realizada com todas as amostras seminais coletadas, de acordo com o Manual da Organização Mundial da Saúde de 2010.

4.2. Processamento seminal

Os espermatozoides móveis foram obtidos após a realização da centrifugação com gradiente de densidade descontínua, onde o plasma seminal também é separado das células. (Percoll, GE Healthcare).

A separação ocorreu em um tubo epeendorf contendo duas camadas de Percoll de diferentes densidades (80% e 40%, respectivamente) e mais superficialmente a amostra. O tubo foi centrifugado a 600xG por 20 minutos (Anexo 3). Os espermatozoides móveis (pellet) foram submetidos a uma lavagem com meio de Human Tubal Fluid (HTF) a 600xG por 10 minutos (1).

4.2.1. Estudo piloto força de centrifugação

É sabido que a força da centrifugação durante o processamento de amostras seminais é de extrema importância. Deve haver uma força de centrifugação ideal em que a centrifugação precise ser útil em sua função de separar células vivas e com maior motilidade, além disso é desejável que o nível de produção de EROs seja pequeno, na tentativa de diminuir possíveis danos oxidativos.

Com isso foi realizado um estudo piloto analisando seis amostras seminais quanto à atividade mitocondrial e à motilidade dos espermatozoides antes e depois da centrifugação a 300xG e a 600xG durante 20 minutos com lavagem em meio de cultura HTF por 10 minutos.

Nesses testes iniciais foram utilizadas seis amostras seminais em que a força de 600xG apresentou em média células com melhor motilidade e maior porcentagem de mitocôndrias ativas após o processo de gradiente de densidade descontínuo, quando comparado à força de 300xG.

4.3. Diluição da Carnosina

A carnosina (L-carnosine C9625-5g, SIGMA, St Louis, MO, EUA) em pó foi pesada para obtermos uma concentração de 20mM e também de 50mM de acordo com a literatura (39,48). Como em 1000mM temos 226,23 gramas da carnosina, para obtermos 20mM foi necessário diluir $4{,}52.10^{-2}$ gramas em 10 mL de Percoll 80% e 40%, assim como para obtermos uma concentração de 50mM foi necessário diluir

$11,31.10^{-2}$ gramas em 10 mL de Percoll 80% e 40%. Após a diluição, as alíquotas com 500uL foram congeladas e armazenadas para uso em rotina.

4.4. Citometria de fluxo

4.4.1. Padronização da citometria

Para a análise da produção de ânions superóxidos como indicador de estresse oxidativo, foi utilizado a sonda dihidroetídio (DHE) (Molecular Probes, Waltham, MA, E.U.A) (518 nm excitação e 606 nm emissão) em citometria que já havia sido padronizado em nosso laboratório. Já para a análise do potencial de membrana mitocondrial espermática foi utilizado a sonda fluorescente JC-1 (iodeto de 5,5',6,6'-tetracloro1,1'3,3'-tetrametilbenzimidazolilcarcocianina) numa concentração de 153uM, sendo necessário padronizar a técnica em citômetro BD Accuri C6 (Becton Dickinson Biosciences, San Jose, CA, EUA).

Durante a padronização foram realizados diversos testes diversificando o volume final do reagente (0,5uL e 7,5 µL) assim como o tempo de incubação deste com as amostras seminais (15 e 60 minutos) a 37ºC com o tubo aberto. O volume de sêmen utilizado foi obtido a partir da fórmula: 200.10^6 / concentração do sêmen em 10^6.

O fluxo da padronização iniciou com a coleta seminal, submetendo a amostra ao gradiente de densidade descontínuo utilizando Percoll com camadas de 90% e 45% a 300xG por 20 minutos. Após a lavagem com meio de cultura HTF a 300xG por 5 minutos, o pellet foi ressuspendido e a concentração da amostra foi lida em câmara de Neubauer de acordo com OMS 2010. Para a amostra ser analisada no citômetro, uma alíquota foi congelada e descongelada por 30 segundos repetindo esse procedimento 10 vezes na tentativa de termos o controle negativo com espermatozoides mortos, assim como uma outra alíquota com CCCP (cianeto de carbonila metaclorofenilhidrazona) que inibe a fosforilação oxidativa, agindo como agente despolarizante, também na tentativa de produzir controle negativo. Uma terceira alíquota passou pelo processo de capacitação dos espermatozoides utilizando meio HTF suplementado com BSA 1%, após a realização do gradiente de densidade descontínuo, durante 2 horas em incubadora a 37°C, na tentativa de possuir controle positivo com espermatozoides vivos, assim como uma quarta alíquota

que não foi suplementada, passou somente pelo gradiente de densidade descontínuo. A última alíquota continha uma porção da amostra capacitada e uma porção da amostra congelada. Após todas as incubações as alíquotas receberam 300uL de HTF para serem lidas no citômetro.

JC-1 é uma sonda que emite fluorescência verde em FL1 quando encontra-se em monômero, representando baixo potencial de membrana, e emite fluorescência vermelha ou alaranjada quando encontra-se em agregados representando alto potencial de membrana, quando ela está polarizada (49). Com base na padronização e no gráfico 1 (Thermo-Life-Molecular Probes) foi possível classificar e separar as populações de espermatozoides com alto e baixo potencial de membrana mitocondrial. Além disso foi necessário a realização de uma compensação de 13% em FL-1 para que as populações estivessem melhores distribuídas nos eixos.

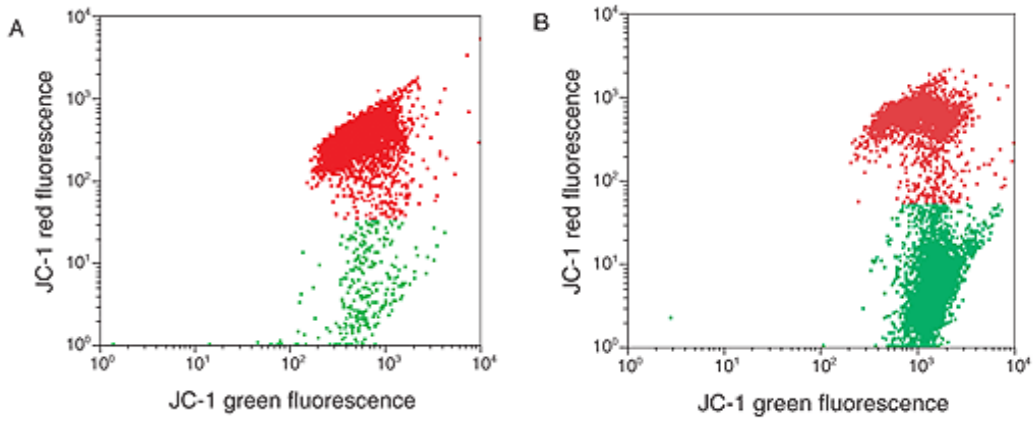


Gráfico 1. Gráficos Dot Plot representando a separação das populações de células com alto e baixo potencial de membrana mitocondrial. Gráfico A com a maioria das células com alto potencial (vermelho) e B com maior quantidade de células com baixo potencial (verde), que receberam tratamento com camptotecina, produzindo um controle negativo (Thermo-Life-Molecular Probes).

4.4.2. Potencial de membrana mitocondrial

Para a avaliação do potencial de membrana mitocondrial, foi utilizada a sonda fluorescente JC-1 através da técnica de citometria de fluxo (Anexo 4), por meio do aparelho BD Accuri C6 (Becton Dickinson). Nesta técnica, as peças intermediárias das células com alto potencial de membrana (-80 a -100 mA), emitem fluorescência

vermelha; já células com baixo potencial de membrana emitem fluorescência verde (50). O volume de sêmen utilizado para avaliação pelo Citômetro de Fluxo seguiu a proporção de 200.10^6 / concentração do sêmen em 10^6 diluído em HTF, sendo adicionado a 7,5 µL da sonda JC-1, e permanecendo incubado com o tubo aberto em estufa a 37°C, com CO_2 6% durante 15 minutos. A análise da técnica foi obtida pela porcentagem de espermatozoides que apresentam alto potencial de membrana mitocondrial (gráfico 2).

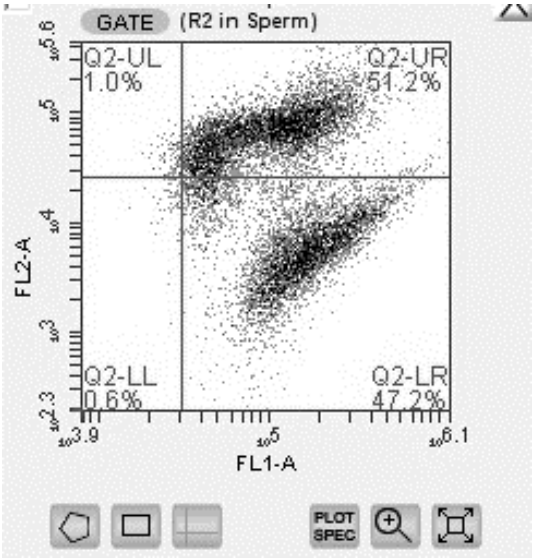


Gráfico 2. Gráfico Dot Plot FL1-FL2 representando as populações de espermatozoides com alto e baixo potencial de membrana mitocondrial.

4.4.3. Produção de ânion superóxido intracelular

A produção de ânions superóxido após o gradiente de densidade descontínuo foi avaliada por meio da sonda dihidroetídio (DHE) (Molecular Probes, Waltham, MA, EUA) (518 nm excitação e 606 nm emissão). Essa sonda exibe fluorescência azul no citosol até sua oxidação, o qual se intercala dentro do DNA da célula marcando o núcleo em vermelho fluorescente. Para essa análise, foram incubados 200.000 espermatozoides com a sonda DHE (concentração inicial de 50 µM diluído em PBS), por um período de 15 minutos em estufa a 37°C. Para a realização da leitura no citômetro de fluxo, foi adicionado a amostra 300 µL de PBS aquecido. O filtro utilizado foi FL2 (565-605nm). Os espermatozoides foram divididos em duas populações: (i)

população negativa para a sonda dihidroetídio e, (ii) população positiva para sonda dihidroetídio, sendo quantificados 10.000 espermatozoides dentro do tamanho e complexidade (*Forward Scatter* X *Side Scatter*) já pré-estabelecidos no citômetro de fluxo BD Accuri C6. A análise da técnica foi obtida pela porcentagem de espermatozoides positivos para a sonda DHE (gráfico 3).

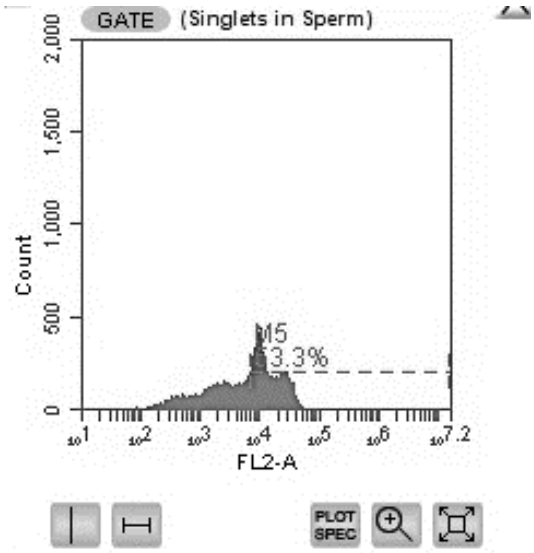


Gráfico 3. Gráfico de picos Count-FL2 representando as populações de espermatozoide com ausência e presença do ânion superóxido, respectivamente

4.5. Análise funcional dos espermatozoides

4.5.1. Análise da fragmentação de DNA

Para esta avaliação foi realizado ensaio Cometa alcalino de acordo com Intasqui e colaboradores (51), que é uma técnica capaz de detectar quebras simples e duplas de DNA em sítios álcalis sensíveis. Neste teste, um total de 100 espermatozoides foram analisados através de um microscópio de epifluorescência equipado com filtro de excitação de 510-560nm, espelho dicróico de 565nm e filtro de barreira de 590nm (Olympus BX-51, Japão), com magnificação de 400x. Os espermatozoides foram classificados em quatro classes (I a IV), sendo a Classe I com o DNA espermático completamente íntegro e a Classe IV com DNA espermático totalmente fragmentado (figura 5).

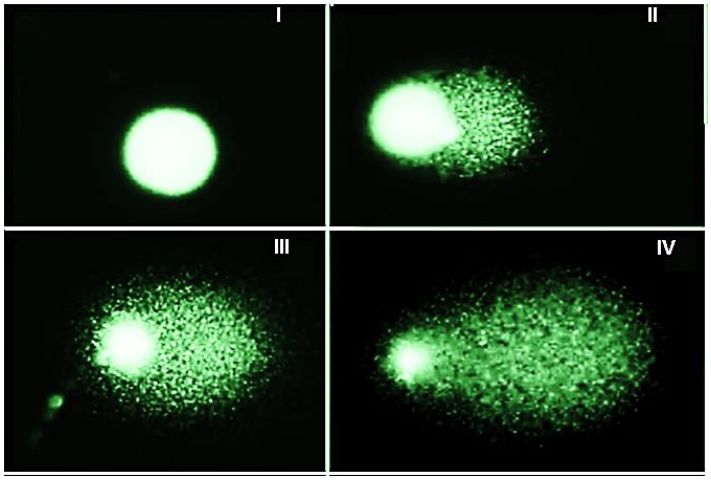


Figura 5. Fotomicrografia com magnificação de 400x representativa da fragmentação do DNA pelo método Ensaio Cometa com presença da cauda de DNA espermático fragmentado, sendo possível a classificação de I a IV de acordo com a intensidade de fragmentação.

4.5.2. Análise da integridade do acrossoma

A integridade do acrossoma foi avaliada pelo método de coloração através da lectina *peanut agglutinin* conjugada a uma sonda fluorescente (FITC-PNA 1 mg/ml - L21409 Invitrogen®). Nesta técnica, o FITC-PNA liga-se exclusivamente às glicoproteínas da membrana externa do acrossoma (52).

Primeiramente, foram realizados dois esfregaços com 15µL da amostra. Após a secagem, as lâminas foram fixadas em metanol 100% por 15 minutos. Após a evaporação, os espermatozoides foram corados com 40µg/mL FITC-PNA por 30 minutos e subsequentemente lavados com água Milli-Q.

Foram analisados 200 espermatozoides em uma magnificação de 1000 vezes utilizando o microscópio de epifluorescência BX-51 equipado com filtro de excitação de 450-490nm, espelho dicroico de 505nm e filtro de barreira de 520nm. Os espermatozoides foram classificados em espermatozoide sem integridade do acrossoma (falha na porção apical da cabeça e do segmento equatorial) e espermatozoide com acrossoma íntegro (porção apical da cabeça e do segmento equatorial, íntegros) (figura 6).

Figura 6. Fotomicrografia com magnificação de 1000x representativa da integridade da membrana acrossomal pelo método da coloração PNA com células com acrossoma íntegro e células sem integridade no acrossoma, respectivamente.

4.5.3. Análise da atividade mitocondrial

A atividade mitocondrial foi avaliada pelo método de coloração por 3,3'diaminobenzidina (DAB). Esta técnica baseia-se na oxidação de DAB pela enzima citocromo c oxidase, onde o reagente é polimerizado e depositado na bainha mitocondrial ao longo da peça intermediária dos espermatozoides (52).

Inicialmente, uma alíquota de fluido seminal é adicionada em uma solução contendo 1 mg/mL de DAB em PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 4,3 mM Na_2HPO_4, 1,4mM KH2PO4, pH=7,4) em uma proporção de 1:1 e incubada por uma hora em banho-maria a 37°C no escuro. Após o período de incubação, foram preparados dois esfregaços de 15 µL em lâminas de microscopia (Precision Glass Line, China). Depois de secas, as lâminas foram fixadas em formaldeído 10% por 10 minutos.

As lâminas foram observadas em microscópio óptico comum (Olympus, Japão) equipado com contraste de fase (Olympus, Japão). Foram contadas 200 células com magnificação de 1000x em imersão e classificadas da seguinte forma (Figura 7):

- Classe I (100% da peça intermediária corada) – Todas as mitocôndrias estão ativas, dando à bainha mitocondrial a aparência de um cilindro compacto e proeminente;
- Classe II (mais de 50% da peça intermediária corada) – A bainha mitocondrial aparece fragmentada, isto é, consiste em segmentos ativos e inativos com predominância dos ativos;
- Classe III (menos de 50% da peça intermediária corada) – A bainha mitocondrial apresenta predominantemente mitocôndrias inativas, apenas poucas mitocôndrias ativas;
- Classe IV (ausência de coloração na peça intermediária) – mitocôndrias totalmente inativas.

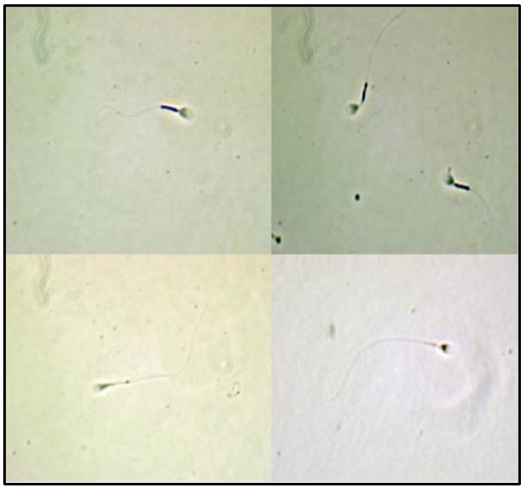


Figura 7: Fotomicrografia com magnificação de 1000x representativa da avaliação de atividade mitocondrial pelo método da coloração DAB com células classificadas de I à IV.

4.6. Análise da integridade de membrana plasmática

Em um tubo, foram misturados 50 µL de fluido seminal e 50 µL de suspensão eosina-nigrosina (45380, 50420, Merck, Alemanha). Após 30 segundos foi preparado esfregaço do material em lâmina de vidro. Depois de seca, a lâmina foi observada em microscópio óptico comum (Olympus, Japão) com magnificação de 1000 vezes (imersão). Contados 100 espermatozoides, classificamos em vivos (não-corados) e mortos (corados) (figura 8). O resultado foi expresso em percentagem de células vivas (1).

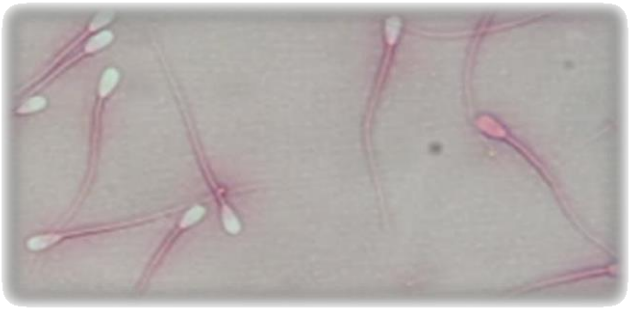


Figura 8: Fotomicrografia com magnificação de 1000x representativa da vitalidade espermática pelo método da coloração Eosina/Negrosina, onde os espermatozoides corados em rosa possuem sua membrana fragmentada e estão mortos, e os espermatozoides brancos possuem integridade de membrana, portanto estão vivos.

4.7. Análise da motilidade espermática

As motilidades espermáticas total e progressiva foram avaliadas pelo Sistema Computadorizado da Motilidade (CASA - Computer Assisted Sperm Aanalysis; Hamilton-Thorne, Massachusetts, EUA), sendo expressas em porcentagem de células móveis e com movimento progressivo (53). Além das motilidades, outras variáveis de movimento espermático foram avaliadas (quadro 1).

Quadro 1 - Siglas, características do movimento espermático e seus respectivos significados

Sigla	Terminologia	Significado
VAP	Velocidade média de percurso (µm/s)	Velocidade média do espermatozoide considerando-se um caminho suavizado.
VSL	Velocidade retilínea (µm/s)	Velocidade média em função da linha reta estabelecida entre o primeiro e o último ponto da trajetória do espermatozoide
VCL	Velocidade curvilínea (µm/s)	Velocidade da trajetória real do espermatozoide
ALH	Amplitude do movimento lateral da cabeça (µm)	Amplitude do deslocamento médio da cabeça do espermatozoide em sua trajetória real.
BCF	Frequência de batimento cruzado (Hz)	Número de vezes que a cabeça do espermatozoide cruza a direção do movimento
STR	Retilinearidade (VSL/VAP, %)	Qualidade do movimento retilíneo suavizado percorrido
LIN	Linearidade (VSL/VCL, %)	Qualidade do movimento retilíneo real Percorrido

4.8. Análise estatística

Para esse estudo foi realizado um cálculo amostral *post-hoc* utilizando o software GPower 3.1.7. A análise estatística foi realizada através do SPSS 21.0 para Windows®. Inicialmente, toda a análise descritiva dos dados foi feita, e então foi utilizado o teste de Kolmogorov-Smirnov para verificar a normalidade da distribuição dos dados, além disso foi utilizado o teste de Mauchly para verificar a esfericidade dos dados, por se tratar de uma análise de medidas repetidas. Para os dados normais os grupos foram comparados utilizando o teste General Linear Model (GLM) com *post hoc* de Sidak, e para os dados não normais foi utilizado o teste não paramétrico de Friedman com *post hoc* de Games Howell, adotando um α de 5%. Além disso o poder observado pelo teste foi levado em consideração.

5. RESULTADOS

5.1. Cálculo amostral

O início do projeto deu-se sem cálculo de amostra *a priori,* entretanto após a obtenção de uma amostra com 22 pacientes foi calculado, a partir de uma estatística prévia, que com um tamanho de efeito de 0,173 em decorrência dos dados de DAB I, nível de significância de 5%, o poder observado foi de 38,5% (tabela 1). Com isso notamos a necessidade de aumentar a amostra desse estudo para um total de 34.

Tabela 1: Cálculo amostral *post hoc*.

F teste - ANOVA: Medidas repetidas, dentro dos fatores		
Análise: Post hoc: Cálculo do poder observado		
Entrada: Tamanho de efeito f	=	0.173
Erro α	=	0.05
Tamanho total amostral	=	22
Número de grupos	=	1
Número de medidas	=	3
Correção para medidas repetidas	=	0.5
Correção de não esfericidade	=	1
Saída: Power (1-β err prob)	=	**0.3856980**

5.3. Citometria de fluxo

Após a análise estatística com 34 amostras podemos observar que não houve diferença estatisticamente significante entre os grupos tanto para a produção do ânion superóxido intracelular (DHE) quanto para o potencial de membrana mitocondrial (JC1), ambos analisado por citometria (tabela 2).

Tabela 2. Resultados das análises em citometria de fluxo dos espermatozoides para produção de ânion superóxido e potencial de membrana mitocondrial nos grupos controle (0), grupo 20mM e grupo 50Mm. Os grupos foram comparados com o teste GLM seguindo do *post-hoc* de Sidak para DHE e teste não paramétrico de Friedman com *post-hoc* de Games-Howell para JC1.

	0 (n=34)	**20mM (n=34)**	**50mM (n=34)**	**p**
Produção de ânion superóxido (%)				
Média; DP	60.3; 17.74	60.4; 16.82	57.6; 16.93	0,169
IC (95%)	54.16 – 66.54	54.55 – 66.24	51.70 – 63.52	
Potencial de membrana mitocondrial (%)$^{\Omega}$				
Mediana; IR	94.3; 8.0	95.0; 5.60	93.9; 8.90	0,223
Q1 – Q3	88.45 – 96.45	92.10 – 97.72	88.60 – 97.52	

Produção de ânion superóxido – % de espermatozoides com presença do ânion superóxido intracelular representante do estresse oxidativo; Potencial de membrana mitocondrial - % de espermatozoides com alto potencial de membrana mitocondrial; DP – Desvio Padrão; IC (95%) – intervalo de confiança de 95%; JC1$^{\Omega}$ - foi utilizado o teste não paramétrico de Friedman com *post hoc* de Games Howell; IR – Intervalo interquartil; Q1-Q3 – Representam o primeiro e o terceiro quartil, respectivamente

5.4. Análises funcionais dos espermatozoides e vitalidade espermática.

Após a análise estatística podemos observar que houve diferença estatisticamente significante em DAB classe I (p= 0,002), com um poder observado de 85,3%, onde o grupo 50 mM apresentou médias maiores comparadas ao grupo 0 (sem carnosina), ou seja, com mais espermatozoides com 100% das mitocôndrias ativas (tabela 3).

Tabela 3. Resultados das análises funcionais dos espermatozoides e integridade de membrana plasmática nos grupos controle (0), grupo 20mM e grupo 50mM. Os grupos foram comparados com o teste GLM seguindo do *post-hoc* de Sidak e teste não paramétrico de Friedman com *post-hoc* de Games-Howell quando necessário.

	0 (n=34)	20mM (n=34)	50mM (n=34)	*p*
Integridade de membrana plasmática (%)				
Média; DP	52.0; 14.29	54.4; 14.38	55.3; 11.39	0,260
IC (95%)	47.01 – 56.98	49.42 – 59.46	51.37 – 59.32	
PNA (% íntegros) $^{\Omega}$				
Mediana; IR	76.7; 10.00	78.0; 12.90	78.0; 9.50	0,857
Q1 – Q3	70.87 – 80.87	70.75 – 83.62	73.00 – 82.50	
DAB I (%)				
Média; DP	13.0; 5.98[a]	14.5; 6.44[a]	15.8; 5.48[b]	0,002
IC (95%)	10.97 – 15.14	12.31 – 16.80	13.97 – 17.79	
DAB II (%)				
Média; DP	62.2; 2.61	62.4; 2.27	63.8; 1.93	0,332
95% IC	56.76 - 67.64	57.75 – 67.19	59.79 – 67.84	
DAB III (%)$^{\Omega}$				
Mediana; IR	20.7; 19.00	20.0; 10079	17.5; 17.60	0,374
Q1 – Q3	15.00 – 34.00	14.00 – 28.12	11.87 – 29.50	
DAB IV (%)$^{\Omega}$				
Mediana; IR	0.0; 1.00	0.0; 1.00	0.0; 0.50	0,680
Q1 – Q3	0.00 – 1.00	0.00 – 1.00	0.00 – 0.50	
Cometa I (%)$^{\Omega}$				
Mediana; IR	6.0; 8.00	5.5; 8.30	8.5; 9.00	0,977
Q1 – Q3	2.00 – 10.00	2.00 – 10.25	2.00 – 11.00	
Cometa II (%)				
Média; DP	73.1; 9.28	72.2; 12.37	69.4; 9.32	0,216
IC (95%)	69.87 -76.35	67.96– 76.56	66.15 – 72.66	
Cometa III (%)$^{\Omega}$				
Mediana; IR	16.0; 10.30	15.0; 12.00	18.0; 13.00	0,601
Q1 – Q3	11.75 – 22.00	10.00 – 22.00	14.00 – 27.00	
Cometa IV (%)$^{\Omega}$				
Mediana; IR	1.0; 3.00	2.0; 3.30	2.0; 5.00	0,211
Q1 – Q3	0.00 – 3.00	0.00 – 3.25	0.00 – 5.00	

PNA – integridade acrossômica; Integridade de membrana plasmática - % de espermatozoides vivos; DAB – atividade mitocondrial; Cometa – fragmentação de DNA espermático; DP – Desvio Padrão; IC (95%) – intervalo de confiança de 95%; Ω - foi utilizado o teste não paramétrico de Friedman com *post hoc* de Games Howell; IR – Intervalo interquartil; Q1-Q3 – Representam o primeiro e o terceiro quartil, respectivamente.

a,b, – Diferentes letras indicam diferença estatisticamente significante entre os grupos com teste *post hoc* ($p<0.05$).

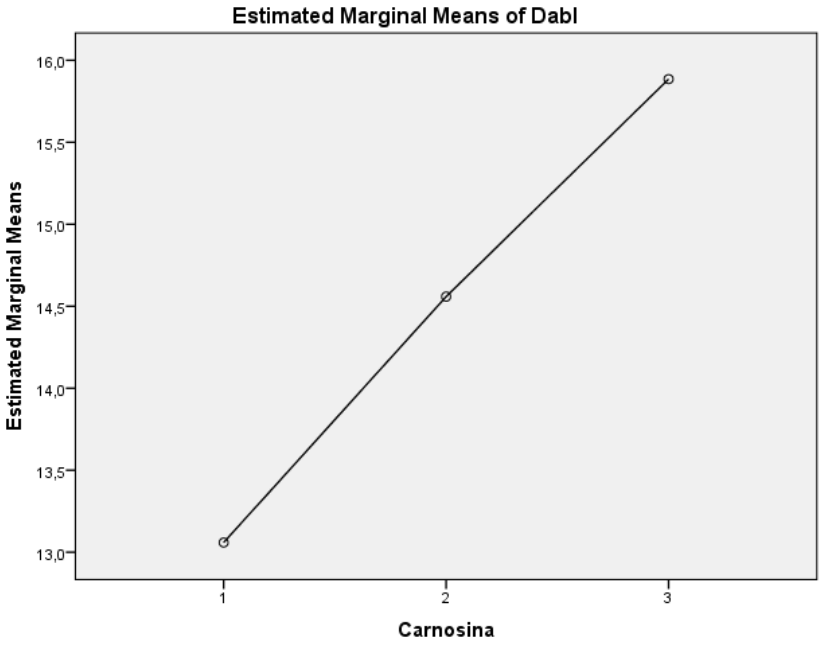


Gráfico 4: Gráfico representativo das médias de DAB classe I, onde houve diferença estatisticamente significativa (entre 0 e 50 mM, no gráfico grupos 1 e 3).

5.5. Análise da motilidade espermática

Após a análise estatística podemos observar que houve diferença estatisticamente significante em % de espermatozoides móveis (Móveis), % de espermatozoides progressivos, velocidade média de percurso (VAP), velocidade retilínea (VSL), velocidade curvilínea (VCL), frequência de batimento cruzado (BCF) e linearidade (LIN) todos com p< 0,0001, entre os grupos, e um poder observado de 100% (tabela 4).

Tabela 4: Análise da motilidade espermática por meio do Sistema Computadorizado da Motilidade (CASA - Computer Assisted Sperm Aanalysis) antes e após do gradiente de densidade descontínuo com os grupos controle (0), grupo 20Mm e grupo 50Mm.

	Antes (n=34)	0 (n=34)	20 mM (n=34)	50mM (n=34)	p
Móveis(%)					
Média; DP	29.3; 13.25[a]	47.1; 25.20[b]	39.7; 21.12[c]	39.0; 22.74[c]	< 0,0001
IC (95%)	24.70 – 33.95	38.34 – 55.93	33.34 – 47.07	31.12 – 46.99	
Progressivos(%)					
Média; DP	18.5; 11.09[a]	35.8; 21.86[b]	27.9; 18.10[c]	27.0; 18.16[c]	< 0,0001
IC (95%)	14.66 – 22.39	28.26 – 43.51	21.68 – 34.31	20.70 – 33.38	
VAP(µm/s)					
Média; DP	43.3; 9.16[a]	60.5; 13.92[b]	53.7; 13.25[c]	49.3; 13.32[d]	< 0,0001
IC (95%)	40.19 – 46.58	55.68 – 65.40	49.13 – 58.38	44.66 – 53.96	
VSL(µm/s)					
Média; DP	37.4; 9.36[a]	54.1; 14.45[b]	47.5; 13.58[c]	42.4; 12.82[d]	< 0,0001
IC (95%)	34.13 – 40.67	49.09 – 59.18	42.76 – 52.24	37.93 – 46.88	
VCL(µm/s)					
Média; DP	71.0; 10.73[a]	93.3; 16.34[b]	87.6; 15.85[c]	82.3; 16.29[c]	< 0,0001
IC (95%)	67.26 – 74.75	87.64 – 99.05	82.08 – 93.14	76.69 – 88.06	
ALH[Ω](µm)					
Mediana; IR	3.5; 0.84	4.0; 1.31	3.8; 0.93	3.7; 0,73	0,735
Q1 – 13	3.18 – 4.02	3.40 – 4.71	3.47 – 4.40	3.30 – 4.02	
BCF[Ω](Hz)					
Mediana; IR	28.6; 5.70[a]	32.3; 3.85[b]	33.1; 4.60[b]	33.8; 3.50[b]	< 0,0001
Q1 – Q3	25.50 – 31.20	30.35 – 34.20	31.05 – 35.65	31.95 – 35.42	

Continua..

...Continuação tabela 4

STR$^{\Omega}$(VSL/VAP, %)					
Mediana; IR	83.7; 5.80	88.2; 4.60	86.2; 5.30	85.0; 5.80	0,092
Q1 – Q3	80.45 – 86.25	84.87 – 89.50	82.75 – 88.00	82.25 – 88.00	
LIN(VSL/VCL, %)					
Média; DP	51.5; 6.88[a]	56.6; 8.44[b]	52.2; 8.22[a]	49.8; 7.57[a,b]	< 0,0001
IC (95%)	49.19 – 53.99	53.26– 59.56	49.40 – 55.14	47.07 – 52.36	
Elongação$^{\Omega}$ %					
Mediana; IR	63.5; 4.30	62.7; 5.20	61.5; 5.00	62.2; 4.30	0,980
Q1 – Q3	61.25 – 65.50	59.87 – 65.07	59.50 – 64.52	60.37 – 64.70	

Móveis – espermatozoides móveis; Progressivos - motilidade progressiva; VAP – velocidade média de percurso; VSL – velocidade retilínea; VCL – velocidade curvilínea; ALH – amplitude do movimento lateral da cabeça; BCF – frequência do batimento cruzado; STR – retilinearidade; LIN – linearidade; DP – Desvio Padrão; IC (95%) – intervalo de confiança de 95%; $^{\Omega}$ - foi utilizado o teste não paramétrico de Friedman com *post hoc* de Games Howell; IR – Intervalo interquartil; Q1-Q3 – Representam o primeiro e o terceiro quartil, respectivamente

a,b, c, d – Diferentes letras indicam diferença estatisticamente significante entre os grupos após o teste *post hoc* ($p<0.05$).

6. DISCUSSÃO

O estresse oxidativo é de grande relevância para a infertilidade masculina, pois pode ser detectado em até 40% dos homens inférteis (54), resultando do desbalanço entre as espécies reativas de oxigênio (EROs) e os antioxidantes presentes no plasma seminal (5,6) podendo levar à danos nos lipídeos poli-insaturados presentes na membrana da célula espermática, assim como danos ao DNA, RNA e proteínas (9). Este desbalanço também pode ser observado quando da aplicação de biotecnologias da reprodução como a criopreservação do sêmen (55), as técnicas de fertilização in vitro e técnicas que necessitem da manipulação excessiva do sêmen como a separação do plasma por meio da centrifugação (12). Entretanto, a presença de EROs é de extrema importância, quando em quantidades fisiológicas, pois estão envolvidas no processo de fertilização do oócito pelo espermatozoide, participando da regulação de processos como hiperativação, capacitação, interação com a zona pelúcida e reação acrossômica (9,14). Com isso, a suplementação de antioxidantes oral ou *in vitro* tem sido reportado como uma tentativa de minimizar danos provocados pelo estresse oxidativo. O presente estudo teve como objetivo avaliar funcionalmente os espermatozoides após o processamento seminal por meio do gradiente de densidade descontínuo de Percoll suplementado com duas diferentes concentrações do antioxidante carnosina.

A carnosina é um dipeptídeo que exerce potente função antioxidante (32) por neutralizar o radical hidroxila (38). Esse radical pode surgir quando há uma reação com íons ferro ou cobre que são abundantes nas células, por meio das reações de Fenton e Haber-Weis (17). Além da neutralização desse radical, a carnosina tem sido reportada importante em outras funções biológicas como a capacidade de reagir com aldeídos reativos, em especial os alfa e beta insaturados (40–42), como acroleína, 4hidroxi-2-hexenal (HHE), 4hidroxi-2-nonenal (HNE) e principalmente o malondialdeído. Nesse sentido, essa reação ocorreria por meio de “mecanismos sacrifícios” onde reagiria com aldeído (43) evitando danos a nível de lipídeos, proteínas e DNA, e assim levando à facilitação da detoxificação desses produtos (44–47).

Na produção energética do processo de respiração celular, a fase da glicólise é dividida em duas etapas: fase preparatória e fase compensatória. Na fase

preparatória há um gasto de 2 ATP para transformar o substrato glicose nos subprodutos gliceraldeído-3-fosfato e diidroxiacetona-fosfato, onde atua o dipeptídeo carnosina. Já na fase compensatória, o subproduto final é o piruvato, produzindo 4 ATP e 2NADH (figura 9) (17).

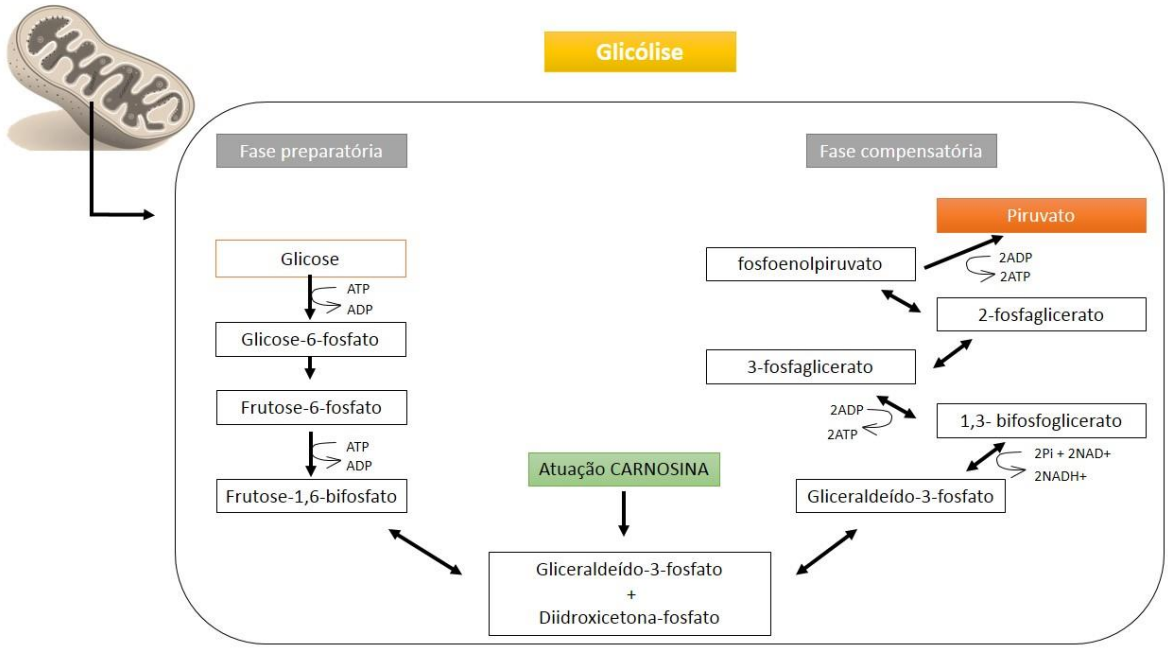


Figura 9: Representação da glicólise para a produção energética pela mitocôndria, contendo as fases preparatória (gasto de 2 ATPs) e compensatória (produção de 4ATPs e 2NADH$^+$). Adaptado de Bioquímica Médica Básica de Marks.(17)

O grupo amino terminal do dipeptídeo carnosina reage, pelas reações de Amadori e Maillard, com aldeídos e ceto grupos de açúcares (39). É particularmente reativa com os açúcares fosforilados intermediários da glicólise, o que dá à carnosina a habilidade de inibir competitivamente a glicosilação de proteínas, pelo menos em experimentos *in vitro* (56–58). Cada glicolisação leva a formação de moléculas de alto peso molecular conhecidos como produtos finais avançado de glicação, ou AGES, que tem sido relacionados com a contribuição para a senescência fenotípica (39). Isso sugere que a carnosina iniba a atividade da glicólise, inibindo também a produção de AGES (59) e, por conseguinte, a geração de ATP em células. O efeito pode ser revertido pela adição de piruvato (e pelo menos dois outros intermediários do ciclo de Krebs) (48). Esses com certeza estimulariam a respiração a gerar ATP, atuando na fase glicolítica e permitindo o crescimento normal de células. Isso também sugere que

outro produto químico que reaja com açúcares também iniba o crescimento de células na ausência de piruvato(60).

O piruvato é o produto final da glicólise, podendo ser convertido a ácido lático durante o metabolismo anaeróbico, ou convertido a acetil CoA, que alimenta o ciclo do ácido tricarboxílico para gerar ATP pela respiração aeróbica. Dentre os intermediários do ciclo, o alfa-cetoglutarato e o oxalacetado são os únicos a possuir um efeito muito similar ao piruvato, ou seja, permitir que a carnosina não se torne tóxica e melhore o crescimento de células, atuando inclusive no retardamento da senescência celular e sendo efetiva em sua função antioxidante (39). Apesar de alguns aminoácidos possuírem interação sinérgica com o piruvato, como por exemplo a alanina, que pode ser convertido em piruvato, e o glutamato, que pode ser convertido a alfa-cetoglutarato, nenhum deles são efetivos junto à carnosina.

No presente estudo foi observado que a presença de 50mM do antioxidante exógeno carnosina suplementado nas camadas do gradiente de densidade descontinuo amplificou a porcentagem de espermatozoides com 100% das mitocôndrias ativas quando comparado ao controle sem adição do mesmo antioxidante. Esse achado demonstra que os danos causados pela centrifugação provavelmente foram atenuados pela suplementação com a carnosina (38). Nessa ação a tendência é que haja um equilíbrio EROs/antioxidante, na intenção de prevenir prováveis danos que venham surgir e prejudicar a membrana mitocondrial espermática (61). Essa organela, sob a ação de EROs induzidas pode elevar o nível de elétrons livres gerando alterações nos complexos I e II da cadeia transportadora de elétrons da mitocôndria provocando a redução da ubiquinona ou coenzima Q em semiquinona, processo esse que transfere elétrons livres e produz o radical livre superóxido (62). Na mesma ótica, ainda não foi possível observar diferenças no uso do antioxidante quando falamos em potencial de membrana mitocondrial e presença do ânion superóxido intracelular, como marcador do EO. Uma possível limitação deste trabalho para análise do estresse oxidativo poderia ter sido sanada com a realização de outras avaliações, utilizando sondas fluorescentes que detectassem o radical hidroxila (OH^-), por exemplo, ou até da técnica de TBARs por detecção da reação entre o ácido tiobarbitúrico e o malondialdeído. Ao passo que podemos encontrar estudos afirmando que a suplementação oral com a carnosina traz benefícios na

função cognitiva de homens, agindo como neutralizadora de radicais livres no sistema nervoso central (37).

Analisar o potencial de membrana mitocondrial de uma célula pode ser um desafio, pois o mecanismo que leva a polarização ou despolarização da mesma envolve diversas etapas e moléculas. Os dados demonstram que a grande maioria das amostras, tanto com antioxidante quanto sem, se apresentaram com porcentagens altas de células com alto potencial de membrana mitocondrial, e isso pode estar diretamente relacionado com os reais benefícios que o processamento seminal por meio de gradiente de densidade descontínuo vem trazer às amostras seminais, quando realiza sua função de separar as melhores e mais viáveis células (1). Por outro lado, o meio de cultivo utilizado durante o preparo desta análise, HTF, contém um cristal vermelho que age como indicador de pH denominado vermelho de fenol e que possui propriedade de perder prótons, aumentando o pH do meio (63). Com meio mais básico a sonda JC1 que apresenta fluorescência vermelha quando está em agregados, pode ter participado de uma sobreposição das fluorescências vermelhas juntamente com o meio HTF utilizado, representando sempre altas porcentagens de células com alto potencial de membrana mitocondrial (49). Além disso, observar uma redução, nem que seja mínima como observado no grupo que recebeu suplementação com 50mM de carnosina nas camadas de Percoll, nas porcentagens de células com alto potencial de membrana já pode ser indicativo de prejuízo à produção de ATP.

Na cascata de reações do processo de estresse oxidativo existem algumas espécies reativas de oxigênio, e dentre elas o ânion superóxido pode ser detectado por meio da sonda DHE. Os dados obtidos desta técnica mostraram que a suplementação com carnosina não foi capaz de diminuir a presença de ânion superóxido nas amostras espermáticas. É possível que a alta reatividade da carnosina com o radical livre hidroxila, tenda a neutralizar somente esse radical (38). Dessa forma observamos que a presença do ânion superóxido, um radical de início da cascata de estresse oxidativo, não sofre alterações no sentido de ser amenizado, mesmo após o processamento seminal por meio de gradiente de densidade descontínuo com camadas suplementadas com o antioxidante. Em contrapartida é sabido que a administração de carnosina tem sido constante em estudos relacionados ao estresse oxidativo, envelhecimento e crescimento de culturas celulares, mostrando

que a presença do antioxidante tem aumentado o tempo de vida em cultura de células como fibroblastos tanto humanas quanto de ratos (64), além da redução do encurtamento dos telômeros dos cromossomos, indicando ação antienvelhecimento (65)

Além disso não foi observado também diferenças significativas nas análises de fragmentação de DNA espermático e na integridade acrossomal dos espermatozoides, o que nos leva a imaginar que o antioxidante, por neutralizar radicais livres de final de cascata do estresse oxidativo, sendo suplementado apenas nas camadas do gradiente de densidade descontínuo durante o processamento seminal pode não ser eficaz. Porém sabe-se que a fragmentação de DNA e a não integridade acrossomal são processos que ocorrem devido ao aumento do estresse oxidativo que é acarretado por exemplo, por respostas inflamatórias, podendo também influenciar células espermáticas (66). Com isso, a suplementação com carnosina em animais que receberam uma endotoxina, o lipossacarídeo, levou a uma diminuição da resposta inflamatória causada no pulmão e por consequência uma supressão das EROs (67).

Na tentativa de obter resultados positivos, como diminuição da fragmentação de DNA e aumento na integridade acrossomal, é possível que a presença da carnosina em contato com a amostra seminal por um período de tempo maior traga maiores benefícios aos espermatozoides (15), visto que é uma análise feita o mais rapidamente possível para maior preservação da membrana celular e fidelidade da análise . No mesmo sentido, podemos acreditar que a carnosina possua melhor atuação antioxidante quando em presença de outros reagentes para levar a melhoras na integridade da membrana plasmática. Entretanto, estudos com administração da carnosina em animais também sugerem uma melhora a nível celular, como por exemplo a quantidade de células germinativas produzidas durante a espermatogênese (68), sugerindo sua importância para a manutenção e homeostase celular (69).

Os resultados em relação à motilidade espermática que este estudo nos trouxe devem ser analisados com cautela. Essa análise confirmou-nos o real benefício do procedimento de separação de células viáveis pelo gradiente de densidade descontínuo (1) de Percoll no tempo e força de centrifugação propostos, pois os

valores observados para a maioria dos parâmetros analisados foram maiores no grupo antes do procedimento de separação celular quando comparado aos tratamentos após a centrifugação. Mesmo sendo nítida a melhora que as variáveis % de espermatozoides móveis, progressivos, VAP, VSL, VCL e LIN apresentaram após este procedimento, quando comparamos as concentrações de carnosina utilizadas durante esta etapa, as variáveis mostraram melhores índices em presença de 20mM do antioxidante. A frequência de batimento cruzado, variável mensurada nesse protocolo de motilidade, obteve uma melhora com a suplementação de 50mM de carnosina, mostrando possível relação do antioxidante com a mitocôndria espermática. Uma vez que os resultados ainda nos dê incertezas em relação à utilização da carnosina suplementada nas camadas do gradiente de densidade descontínuo, devemos levar em consideração que a mitocôndria, organela fundamental na análise dos parâmetros de motilidade espermática, é um ambiente celular crucial na produção de EROs. Produção essa que pode ser amplificada por conta da retroalimentação que produz ainda mais EROs e que a presença do antioxidantes não foi capaz de neutralizar devidamente por escassez no tempo te contato com as células ou até mesmo por não ser o melhor antioxidante exógeno no desempenho dessa função na ausência de outro reagente. Por outro lado, podemos acreditar que a mitocôndria funcionou em mecanismo compensatório, uma vez que na tentativa de melhorar a motilidade espermática, produzindo mais ATP para tal, elevou sua atividade mitocondrial, como observado nos resultados provenientes da técnica de análise da atividade mitocondrial por meio da sonda DAB.

Somado a isso devemos ressaltar a importância da presença da carnosina, que além de inibir a liberação do citocromo c que leva à proteção mitocondrial contra danos (70), também é possível inibidor da glicólise, o que leva à uma disfunção mitocondrial e desbalanço oxidativo (71), podendo ter interferido nos resultados de motilidade apresentados quando a amostra seminal foi suplementada com o antioxidante. Dessa forma o tratamento com outros reagentes, como subprodutos da fase preparatória da glicólise, por exemplo o gliceraldeído-3-fosfato e a diidroxiacetona-fosfato, poderiam auxiliar no funcionamento da produção energética, afinal o ATP gerado na fase da glicólise é também importante. Sabemos que o piruvato é um intermediário presente na composição do BWW (0,25mM) (1), um dos reagentes necessários para a produção das camadas de gradiente de densidade descontínuo do Percoll utilizado

para a separação dos espermatozoides e eliminação do plasma seminal, entretanto acreditamos que a sua quantidade pode não ter sido suficiente para prevenir um possível efeito citotóxico da carnosina (48) em relação à motilidade espermática, quando comparamos ao grupo sem o antioxidante. Isso nos leva a pensar que a suplementação propriamente do antioxidante com o piruvato, além de outros subprodutos, seria interessante, visto que as quantidades presentes no ambiente estudado podem ter sido reduzidas devido as diluições necessárias para os procedimentos.

Apesar dos resultados apresentados nesse trabalho e da carência na literatura em estudos relacionando a carnosina e espermatozoides humanos, existe uma indicação que ela possa ser benéfica em suplementações de meios celulares que necessitam controlar o desbalanço oxidativo, promovendo manutenção e equilíbrio para sobrevivência de células. Em estudo de 2016, Le Bourhis D e colaboradores observaram uma cinética mais rápida para o desenvolvimento de embriões bovinos e maior viabilidade pós-congelamento quando houve suplementação do meio de cultura com o mesmo antioxidante proposto neste estudo, a carnosina (72).

7. CONCLUSÃO

Em conclusão, os resultados indicam que a suplementação com o antioxidante exógeno carnosina nas camadas do gradiente de densidade descontínuo, quando analisadas amostras seminais humanas, apresentou efeito benéfico aumentando a atividade mitocondrial espermática e frequência do batimento cruzado, amenizando os possíveis danos provocados por esse processamento seminal. Entretanto o mesmo benefício não foi observado para presença do ânion superóxido intracelular, fragmentação do DNA espermático, integridade acrossômica, integridade de membrana plasmática e além disso, observamos uma diminuição nos demais parâmetros da motilidade espermática que foram analisadas nesse estudo.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. WHO | World Health Statistics 2010 [Internet]. WHO. [citado 29 de fevereiro de 2016]. Disponível em: http://www.who.int/whosis/whostat/2010/en/

2. Aitken RJ, Clarkson JS. Cellular basis of defective sperm function and its association with the genesis of reactive oxygen species by human spermatozoa. J Reprod Fertil. novembro de 1987;81(2):459–69.

3. 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.

4. Zini A, de Lamirande E, Gagnon C. Reactive oxygen species in semen of infertile patients: levels of superoxide dismutase- and catalase-like activities in seminal plasma and spermatozoa. Int J Androl. junho de 1993;16(3):183–8.

5. Sikka SC, Rajasekaran M, Hellstrom WJ. Role of oxidative stress and antioxidants in male infertility. J Androl. dezembro de 1995;16(6):464–8.

6. Sikka SC. Relative impact of oxidative stress on male reproductive function. Curr Med Chem. junho de 2001;8(7):851–62.

7. Aitken RJ, Whiting S, De Iuliis GN, McClymont S, Mitchell LA, Baker MA. Electrophilic aldehydes generated by sperm metabolism activate mitochondrial reactive oxygen species generation and apoptosis by targeting succinate dehydrogenase. J Biol Chem. 21 de setembro de 2012;287(39):33048–60.

8. Aitken RJ, Smith TB, Jobling MS, Baker MA, De Iuliis GN. Oxidative stress and male reproductive health. Asian J Androl. fevereiro de 2014;16(1):31–8.

9. Mello Filho AC, Hoffmann ME, Meneghini R. Cell killing and DNA damage by hydrogen peroxide are mediated by intracellular iron. Biochem J. 15 de fevereiro de 1984;218(1):273–5.

10. Aitken RJ. A free radical theory of male infertility. Reprod Fertil Dev. 1994;6(1):19-23; discussion 23-24.

11. de Lamirande E, Jiang H, Zini A, Kodama H, Gagnon C. Reactive oxygen species and sperm physiology. Rev Reprod. janeiro de 1997;2(1):48–54.

12. Donnelly ET, McClure N, Lewis SE. Antioxidant supplementation in vitro does not improve human sperm motility. Fertil Steril. setembro de 1999;72(3):484–95.

13. Griveau JF, Le Lannou D. Effects of antioxidants on human sperm preparation techniques. Int J Androl. outubro de 1994;17(5):225–31.

14. Satorre MM, Breininger E, Beconi MT. Cryopreservation with α-tocopherol and Sephadex filtration improved the quality of boar sperm. Theriogenology. 15 de outubro de 2012;78(7):1548–56.

15. Hughes CM, Lewis SE, McKelvey-Martin VJ, Thompson W. The effects of antioxidant supplementation during Percoll preparation on human sperm DNA integrity. Hum Reprod Oxf Engl. maio de 1998;13(5):1240–7.

16. Aitken RJ, Clarkson JS. Significance of reactive oxygen species and antioxidants in defining the efficacy of sperm preparation techniques. J Androl. dezembro de 1988;9(6):367–76.

17. Bioquimica de Marks [Internet]. [citado 29 de fevereiro de 2016]. Disponível em: http://pt.scribd.com/doc/86519501/Bioquimica-de-Marks#scribd

18. Wagner BA, Buettner GR, Burns CP. Free radical-mediated lipid peroxidation in cells: oxidizability is a function of cell lipid bis-allylic hydrogen content. Biochemistry (Mosc). 19 de abril de 1994;33(15):4449–53.

19. Aitken RJ, Clarkson JS, Fishel S. Generation of reactive oxygen species, lipid peroxidation, and human sperm function. Biol Reprod. julho de 1989;41(1):183–97.

20. Agarwal A, Saleh RA. Role of oxidants in male infertility: rationale, significance, and treatment. Urol Clin North Am. novembro de 2002;29(4):817–27.

21. de Lamirande E, Gagnon C. Impact of reactive oxygen species on spermatozoa: a balancing act between beneficial and detrimental effects. Hum Reprod Oxf Engl. outubro de 1995;10 Suppl 1:15–21.

22. Burton GW, Ingold KU. Vitamin E as an in Vitro and in Vivo Antioxidanta. Ann N Y Acad Sci. Dezembro de 1989;570(1):7–22.

23. Ribas-Maynou J, García-Peiró A, Abad C, Amengual MJ, Navarro J, Benet J. Alkaline and neutral Comet assay profiles of sperm DNA damage in clinical groups. Hum Reprod Oxf Engl. março de 2012;27(3):652–8.

24. Griveau JF, Le Lannou D. Effects of antioxidants on human sperm preparation techniques. Int J Androl. outubro de 1994;17(5):225–31.

25. Sharma RK, Agarwal A. Influence of artificial stimulation on unprocessed and Percoll-washed cryopreserved sperm. Arch Androl. junho de 1997;38(3):173–9.

26. Bispo V da S. Mapeamento de adutos gerados por aldeídos endógenos e exógenos. utilização como biomarcadores de estresse redox. 1º de novembro de 2011 [citado 5 de julho de 2016]; Disponível em: http://bvs.fapesp.br/pt/bolsas/129658/mapeamento-de-adutos-gerados-por-aldeidos-endogenos-e-exogenos-utilizacao-como-biomarcadores-de-est/

27. Hill CA, Harris RC, Kim HJ, Harris BD, Sale C, Boobis LH, et al. Influence of beta-alanine supplementation on skeletal muscle carnosine concentrations and high intensity cycling capacity. Amino Acids. fevereiro de 2007;32(2):225–33.

28. Sale C, Saunders B, Harris RC. Effect of beta-alanine supplementation on muscle carnosine concentrations and exercise performance. Amino Acids. julho de 2010;39(2):321–33.

29. Harris RC, Wise JA, Price KA, Kim HJ, Kim CK, Sale C. Determinants of muscle carnosine content. Amino Acids. julho de 2012;43(1):5–12.

30. Matsukura T, Takahashi T, Nishimura Y, Ohtani T, Sawada M, Shibata K. Characterization of crystalline L-carnosine Zn(II) complex (Z-103), a novel anti-gastric ulcer agent: tautomeric change of imidazole moiety upon complexation. Chem Pharm Bull (Tokyo). novembro de 1990;38(11):3140–6.

31. Matsukura T, Tanaka H. Applicability of zinc complex of L-carnosine for medical use. Biochem Biokhimiia. julho de 2000;65(7):817–23.

32. Hipkiss AR. On the enigma of carnosine's anti-ageing actions. Exp Gerontol. abril de 2009;44(4):237–42.

33. Lopachev AV, Lopacheva OM, Abaimov DA, Koroleva OV, Vladychenskaya EA, Erukhimovich AA, et al. Neuroprotective Effect of Carnosine on Primary Culture of Rat Cerebellar Cells under Oxidative Stress. Biochem Biokhimiia. maio de 2016;81(5):511–20.

34. Zhao J, Shi L, Zhang L-R. Neuroprotective effect of carnosine against salsolinol-induced Parkinson's disease. Exp Ther Med. julho de 2017;14(1):664–70.

35. Babizhayev MA. Biomarkers and special features of oxidative stress in the anterior segment of the eye linked to lens cataract and the trabecular meshwork injury in primary open-angle glaucoma: challenges of dual combination therapy with N-acetylcarnosine lubricant eye drops and oral formulation of nonhydrolyzed carnosine. Fundam Clin Pharmacol. fevereiro de 2012;26(1):86–117.

36. Rokicki J, Li L, Imabayashi E, Kaneko J, Hisatsune T, Matsuda H. Daily Carnosine and Anserine Supplementation Alters Verbal Episodic Memory and Resting State Network Connectivity in Healthy Elderly Adults. Front Aging Neurosci. 2015;7:219.

37. Baraniuk JN, El-Amin S, Corey R, Rayhan R, Timbol C. Carnosine treatment for gulf war illness: a randomized controlled trial. Glob J Health Sci. 4 de fevereiro de 2013;5(3):69–81.

38. Boldyrev AA, Aldini G, Derave W. Physiology and pathophysiology of carnosine. Physiol Rev. outubro de 2013;93(4):1803–45.

39. McFarland GA, Holliday R. Retardation of the senescence of cultured human diploid fibroblasts by carnosine. Exp Cell Res. junho de 1994;212(2):167–75.

40. Aldini G, Carini M, Beretta G, Bradamante S, Facino RM. Carnosine is a quencher of 4-hydroxy-nonenal: through what mechanism of reaction? Biochem Biophys Res Commun. 15 de novembro de 2002;298(5):699–706.

41. Aldini G, Facino RM, Beretta G, Carini M. Carnosine and related dipeptides as quenchers of reactive carbonyl species: from structural studies to therapeutic perspectives. BioFactors Oxf Engl. 2005;24(1–4):77–87.

42. Carini M, Aldini G, Beretta G, Arlandini E, Facino RM. Acrolein-sequestering ability of endogenous dipeptides: characterization of carnosine and homocarnosine/acrolein adducts by electrospray ionization tandem mass spectrometry. J Mass Spectrom JMS. setembro de 2003;38(9):996–1006.

43. Xie Z, Baba SP, Sweeney BR, Barski OA. Detoxification of aldehydes by histidine-containing dipeptides: from chemistry to clinical implications. Chem Biol Interact. 25 de fevereiro de 2013;202(1–3):288–97.

44. Loureiro AP, Di Mascio P, Gomes OF, Medeiros MH. trans,trans-2,4-decadienal-induced 1,N(2)-etheno-2'-deoxyguanosine adduct formation. Chem Res Toxicol. julho de 2000;13(7):601–9.

45. Garcia CCM, Angeli JPF, Freitas FP, Gomes OF, de Oliveira TF, Loureiro APM, et al. [13C2]-Acetaldehyde promotes unequivocal formation of 1,N2-propano-2'-deoxyguanosine in human cells. J Am Chem Soc. 22 de junho de 2011;133(24):9140–3.

46. Salomon RG, Gu X. Critical insights into cardiovascular disease from basic research on the oxidation of phospholipids: the γ-hydroxyalkenal phospholipid hypothesis. Chem Res Toxicol. 21 de novembro de 2011;24(11):1791–802.

47. Yamada S, Funada T, Shibata N, Kobayashi M, Kawai Y, Tatsuda E, et al. Protein-bound 4-hydroxy-2-hexenal as a marker of oxidized n-3 polyunsaturated fatty acids. J Lipid Res. abril de 2004;45(4):626–34.

48. Holliday R, McFarland GA. Inhibition of the growth of transformed and neoplastic cells by the dipeptide carnosine. Br J Cancer. abril de 1996;73(8):966–71.

49. Troiano L, Granata AR, Cossarizza A, Kalashnikova G, Bianchi R, Pini G, et al. Mitochondrial membrane potential and DNA stainability in human sperm cells: a flow cytometry analysis with implications for male infertility. Exp Cell Res. 15 de junho de 1998;241(2):384–93.

50. Gravance CG, Garner DL, Baumber J, Ball BA. Assessment of equine sperm mitochondrial function using JC-1. Theriogenology. junho de 2000;53(9):1691–703.

51. 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.

52. 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.

53. Nichi M, Goovaerts IGF, Cortada CNM, Barnabe VH, De Clercq JBP, Bols PEJ. Roles of lipid peroxidation and cytoplasmic droplets on in vitro fertilization capacity of sperm collected from bovine epididymides stored at 4 and 34 degrees C. Theriogenology. 15 de janeiro de 2007;67(2):334–40.

54. Department of Health annual report 2008 to 2009 - Publications - GOV.UK [Internet]. [citado 5 de maio de 2016]. Disponível em: https://www.gov.uk/government/publications/department-of-health-departmental-report-2009

55. Amidi F, Pazhohan A, Shabani Nashtaei M, Khodarahmian M, Nekoonam S. The role of antioxidants in sperm freezing: a review. Cell Tissue Bank. dezembro de 2016;17(4):745–56.

56. Hipkiss AR, Michaelis J, Syrris P. Non-enzymatic glycosylation of the dipeptide L-carnosine, a potential anti-protein-cross-linking agent. FEBS Lett. 28 de agosto de 1995;371(1):81–5.

57. Holliday R, McFarland GA. A role for carnosine in cellular maintenance. Biochem Biokhimiia. julho de 2000;65(7):843–8.

58. Quinn PJ, Boldyrev AA, Formazuyk VE. Carnosine: its properties, functions and potential therapeutic applications. Mol Aspects Med. 1992;13(5):379–444.

59. Yılmaz Z, Kalaz EB, Aydın AF, Soluk-Tekkeşin M, Doğru-Abbasoğlu S, Uysal M, et al. The effect of carnosine on methylglyoxal-induced oxidative stress in rats. Arch Physiol Biochem. julho de 2017;123(3):192–8.

60. Münch G, Taneli Y, Schraven E, Schindler U, Schinzel R, Palm D, et al. The cognition-enhancing drug tenilsetam is an inhibitor of protein crosslinking by advanced glycosylation. J Neural Transm Park Dis Dement Sect. 1994;8(3):193–208.

61. Hipkiss AR. Aging, Proteotoxicity, Mitochondria, Glycation, NAD and Carnosine: Possible Inter-Relationships and Resolution of the Oxygen Paradox. Front Aging Neurosci. 2010;2:10.

62. Koppers AJ, De Iuliis GN, Finnie JM, McLaughlin EA, Aitken RJ. Significance of mitochondrial reactive oxygen species in the generation of oxidative stress in spermatozoa. J Clin Endocrinol Metab. agosto de 2008;93(8):3199–207.

63. Phenol Red Sodium Salt [Internet]. [citado 5 de outubro de 2017]. Disponível em: https://www.usbio.net/biochemicals/P4040

64. Ikeda D, Wada S, Yoneda C, Abe H, Watabe S. Carnosine stimulates vimentin expression in cultured rat fibroblasts. Cell Struct Funct. abril de 1999;24(2):79–87.

65. Shao L, Li Q-H, Tan Z. L-carnosine reduces telomere damage and shortening rate in cultured normal fibroblasts. Biochem Biophys Res Commun. 12 de novembro de 2004;324(2):931–6.

66. 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.

67. Tanaka K-I, Sugizaki T, Kanda Y, Tamura F, Niino T, Kawahara M. Preventive Effects of Carnosine on Lipopolysaccharide-induced Lung Injury. Sci Rep. 16 de fevereiro de 2017;7:42813.

68. Haeri SA, Rajabi H, Fazelipour S, Hosseinimehr SJ. Carnosine mitigates apoptosis and protects testicular seminiferous tubules from gamma-radiation-induced injury in mice. Andrologia. 2014;46(9):1041–6.

69. McFarland GA, Holliday R. Further evidence for the rejuvenating effects of the dipeptide L-carnosine on cultured human diploid fibroblasts. Exp Gerontol. janeiro de 1999;34(1):35–45.

70. Baek S-H, Noh AR, Kim K-A, Akram M, Shin Y-J, Kim E-S, et al. Modulation of mitochondrial function and autophagy mediates carnosine neuroprotection against ischemic brain damage. Stroke. agosto de 2014;45(8):2438–43.

71. Losano J, Angrimani D, Dalmazzo A, Rui BR, Brito MM, Mendes CM, et al. Effect of mitochondrial uncoupling and glycolysis inhibition on ram sperm functionality. Reprod Domest Anim Zuchthyg. abril de 2017;52(2):289–97.

72. Le Bourhis D, Verachten M, Salvetti P, Hochet M, Schibler L. 78 SUPPLEMENTATION WITH CARNOSINE DURING IN VITRO CULTURE IMPROVES THE QUALITY OF IN VITRO-PRODUCED BOVINE EMBRYOS. Reprod Fertil Dev. janeiro de 2016;29(1):146.

Anexo 1 - Cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TÍTULO DO PROJETO: “O efeito do tratamento com carnosina durante o processamento seminal de amostras humanas por gradiente de densidade descontínuo”.

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

PROCEDIMENTOS A SEREM REALIZADOS: O espermograma é o exame realizado de rotina na pesquisa de todos os casos de infertilidade masculina. Uma alíquota da amostra de sêmen será utilizada para o espermograma e o restante do material será utilizado para as dosagens que serão estudadas nesse experimento, caso haja consentimento. O objetivo desta pesquisa é verificar a qualidade do sêmen de amostras coletadas com 2 a 7 dias de abstinência ejaculatória através de testes funcionais dos espermatozoide.

PROCEDIMENTOS ROTINEIROS: O sêmen será colhido por masturbação no Laboratório de Reprodução Humana / Urologia –UNIFESP, localizado na Rua Napoleão de Barros, 628 – Vila Clementino – São Paulo. A amostra colhida será submetida à realização do espermograma. Nós gostaríamos de obter a sua permissão para incluir sua amostra seminal nesta pesquisa. Para tanto, você deve consentir que nós utilizássemos a amostra do sêmen, somente após a realização completa do seu espermograma, não havendo, portanto, prejuízo do seu exame.

RISCOS E DESCONFORTO: A colheita de sêmen deve ser realizada por masturbação em um recipiente plástico estéril. Este procedimento, assim como a colheita de sangue, pode causar algum desconforto leve para você. A colheita de sêmen na sala de colheita do Laboratório de Reprodução Humana/Urologia da UNIFESP pode ser constrangedora. O deslocamento até o local da colheita também poderá ser inconveniente. Não haverá qualquer ajuda financeira para as despesas de transporte ou alimentação durante sua estadia. Não existe risco de que sua amostra

de sêmen possa gerar filhos. A amostra será utilizada somente para o espermograma e para os testes envolvidos nesta pesquisa.

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

TRATAMENTO OU PROCEDIMENTOS ALTERNATIVOS: Não existem tratamentos ou procedimentos alternativos ao qual você possa optar. Entretanto, você pode escolher por não participar deste estudo.

ESCLARECIMENTOS SOBRE A PESQUISA: Em qualquer etapa deste estudo você terá livre acesso aos profissionais responsáveis para esclarecimentos de eventuais dúvidas. Os investigadores a serem procurados são Luana Nayara Gallego Adami ou Marcilio Nichi, que podem ser encontrados no Laboratório de Reprodução Humana/Urologia, localizado na Rua Napoleão de Barros, 628 – Vila Clementino – São Paulo – S.P. Os telefones de contato são: (11) 5084-3891 / 5084-4162. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP), localizado na Rua Botucatu, 572 – 1°andar – cj.14 – Vila Clementino – São Paulo – S.P. - Telefone: (11) 5571-1062 – Fax: (11) 5539-7162 – e-mail: cepunifesp@epm.br .

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

CONFIDENCIALIDADE: As informações obtidas serão analisadas em conjunto com as dos demais pacientes e a confidencialidade de todos os seus registros será mantida. Entretanto, a UNIFESP e o Ministério da Saúde poderão encaminhar os seus registros, se necessário.

DÚVIDAS SOBRE A PESQUISA: Se você tiver qualquer dúvida sobre pesquisa ou desenvolver qualquer problema relacionado a ela, você deverá entrar em contato com os pesquisadores Luana Nayara Gallego Adami e Marcilio Nichi, que podem ser encontradas no Laboratório de Reprodução Humana / Urologia, localizado a Rua Napoleão de Barros, 628 – Vila Clementino – São Paulo – S.P. - Telefones: (11) 5084-3891 / 5084-4162.

DESPESA E COMPENSAÇÃO: Não serão cobertas despesas pessoais de participantes desta pesquisa em qualquer fase do estudo, incluindo exames; procedimentos, consultas e hospitalização. Assim como, não haverá compensação financeira pela sua participação. Você deverá arcar com todas as suas despesas pessoais vinculadas à sua participação nesta pesquisa.

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

COMPROMISSO DO PESQUISADOR: O material seminal colhido será de uso único e específico para a realização da referida pesquisa, sendo esse um compromisso assumido pelo pesquisador principal.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo "O efeito do tratamento com carnosina durante o processamento seminal de amostras humanas por gradiente de densidade descontínuo". Eu discuti com a pesquisadora Luana Nayara Gallego Adami sobre minha decisão em participar deste estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Também ficou claro que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso hospitalar, quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Este documento será disponibilizado em 2 vias originais, uma permanecerá em poder do pesquisador principal e a outra será entregue ao paciente. Todas as vias deste documento deverão ser rubricadas tanto pelo pesquisador principal quanto pelo paciente.

_____ ____ / ____ / ____

Assinatura do paciente

_____ ____ / ____ / ____

Assinatura do pesquisador principal

_____ ____ / ____ / ____

Assinatura da testemunha

Anexo 2: Aprovação e parecer do Comitê de Ética em Pesquisa UNIFESP

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO - HOSPITAL SÃO PAULO UNIFESP-HSP

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: O Efeito do tratamento com diferentes concentrações do antioxidante Carnosina durante o processamento seminal de amostras humanas.

Pesquisador: Luana Nayara Gallego Adami

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

Versão: 2

CAAE: 57485316.3.0000.5505

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE FEDERAL DE SAO PAULO

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.705.298

Apresentação do Projeto:

Trata-se de emenda ao protocolo

Número do Parecer: 1.683.076

DADOS DO PARECER

CEP/UNIFESP: 879/2016

Objetivo da Pesquisa:

Avaliar o efeito do tratamento de amostras seminais com diferentes antioxidantes sobre os espermatozoides humanos durante a etapa de processamento seminal dessas amostras.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

CONFORME DESCRITO NO PARECER INICIAL

Endereço: Rua Botucatu, 572 1º Andar Conj. 14
Bairro: VILA CLEMENTINO **CEP:** 04.023-061
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)5571-1062 **Fax:** (11)5539-7162 **E-mail:** secretaria.cepunifesp@gmail.com

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de estudo com o objetivo acadêmico de Mestrado, vinculado ao Departamento/Disciplina de Cirurgia da Unifesp, Campus São Paulo. Orientação: Prof. Dr. Marcilio Nichi Coorientação: Prof Dr. Ricardo Pimenta Bertolla

Um estudo transversal será realizado incluindo 30 pacientes do sexo masculino entre 20 e 50 anos, encaminhados ao Laboratório de Andrologia do Setor de Reprodução Humana da Disciplina de Urologia,Departamento de Cirurgia, da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP) com queixas de infertilidade conjugal.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

APRESENTAÇÃO DE EMENDA AO PROTOCOLO

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

EMENDA

O presente estudo aprovado comtemplava a suplementação de dois antioxidantes diferentes (carnosina e glutationa) durante o processamento seminal de amostras humanas, porém houve uma alteração na aplicação dessa suplementação em amostras. Agora será contemplado apenas o antioxidante Carnosina em diferentes concentrações, pois acredita-de ter maior impacto científico.

Sendo assim, houve apenas essa alteração de metodologia, sem alteração do desenho do estudo, modificando o título

de "O Efeito do tratamento com diferentes antioxidante durante o processamento seminal de amostras humanas"

para "O Efeito do tratamento com diferentes concentrações do antioxidante Carnosina durante o processamento seminal de amostras humanas".

Considerações Finais a critério do CEP:

- O parecer do relator foi acatado pelo colegiado.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_780462_E1.pdf	23/08/2016 10:55:22		Aceito

Endereço: Rua Botucatu, 572 1º Andar Conj. 14
Bairro: VILA CLEMENTINO **CEP:** 04.023-061
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)5571-1062 **Fax:** (11)5539-7162 **E-mail:** secretaria.cepunifesp@gmail.com

Outros	cartaaoCEPEMEDA.pdf	23/08/2016 10:32:23	Luana Nayara Gallego Adami	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	cartadeanuencia.pdf	27/06/2016 10:09:38	Luana Nayara Gallego Adami	Aceito
Folha de Rosto	folhaderosto.pdf	16/05/2016 15:51:29	Luana Nayara Gallego Adami	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projeto.docx	11/05/2016 16:32:10	Luana Nayara Gallego Adami	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	tcle.docx	11/05/2016 16:31:46	Luana Nayara Gallego Adami	Aceito

Situação do Parecer:
Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:
Não

SAO PAULO, 31 de Agosto de 2016

Assinado por:
Miguel Roberto Jorge
(Coordenador)

Endereço: Rua Botucatu, 572 1º Andar Conj. 14
Bairro: VILA CLEMENTINO **CEP:** 04.023-061
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)5571-1062 **Fax:** (11)5539-7162 **E-mail:** secretaria.cepunifesp@gmail.com

Anexo 3: Análise descritiva dos dados

Todas as 34 amostras seminais coletadas foram analisadas descritivamente de acordo com a tabela seguinte (tabela 5).

Tabela 5: Análise descritiva de todas as amostras seminais humanas utilizadas nesse estudo.

	Amostra seminal (n=34)
Idade (anos)	
Média; DP	34.44; 6.11
mínimo - máximo	21.00 – 47.00
IC (95%)	32.30 – 36.57
Abstinência (dias)	
Média; DP	4.18; 1.38
mínimo – máximo	2.00 – 7.00
IC (95%)	3.69 – 4.65
Concentração espermática (milhão/mL)	
Média; DP	99.20; 56.17
mínimo – máximo	15.20 – 258.80
IC (95%)	79.59 – 118.80
Contagem total espermática	
Média; DP	428.71; 290.73
mínimo – máximo	77.20 – 1490.30
IC (95%)	327.27 – 530.15
Motilidade progressiva (%)	
Média; DP	55.82; 9.46
mínimo – máximo	35.00 – 69.00
IC (95%)	52.52 – 59.12
Motilidade não progressiva (%)	
Média; DP	5.53; 2.24
mínimo – máximo	2.00 – 11.00
IC (95%)	4.74 – 6.31

Continua...

Imóveis (%)	
Média; DP	38.65; 8.72
mínimo – máximo	2.00 – 11.00
IC (95%)	35.60 – 41.69
Volume (mL)	
Média; DP	4.54; 1.96
mínimo - máximo	2.30 – 12.20
IC (95%)	3.85 – 5.23
pH	
Média; DP	8.20; 0.24
mínimo - máximo	8.00 – 8.50
IC (95%)	8.11 – 8.29
Morfologia (% normal)	
Média; DP	8.18; 2.28
mínimo – máximo	4.00 – 12.00
IC (95%)	7.34 – 9.00
Tempo liquefação (min)	
Média; DP	33.38; 11.78
mínimo - máximo	10.00 – 50.00
IC (95%)	29.27 – 37.50
Células redondas (milhão/mL)	
Média; DP	1.92; 1.93
mínimo - máximo	0.30 – 8.70
IC (95%)	1.24 – 2.60
Neutrófilos (milhão/mL)	
Média; DP	0.32; 0.90
mínimo - máximo	0.00 – 4.90
IC (95%)	0.00 – 0.64

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

Bibliografia consultada

Normas para teses e dissertações [Internet]. 2ed. rev. e corrigida. São Paulo: Universidade Federal de São Paulo, Biblioteca Antônio Rubino de Azevedo, Coordenação de cursos; 2015 [cited *Year Month Day*]. Available from: htttp://www.bibliotecacsp.unifesp.br/Documentos-Apostila/normas-para-teses-e-dissertacoes