

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: FISILOGIA

**AVALIAÇÃO DO CONTEÚDO MUCOPROTEICO E DA ATIVIDADE  
DE ENZIMAS PROTEOLÍTICAS NO PLASMA SEMINAL  
HIPERVISCOZO**

Aluno: Charles Teilor Rodrigues

Orientador: Prof. Dr. Edison Capp

Dissertação de Mestrado apresentado ao Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas: Fisiologia.

PORTO ALEGRE

2018

Agradecimento à família e aos amigos pelo suporte ao longo do mestrado.

*In memoriam* de Jéferson da Rocha Schmitt.

## RESUMO

Hiperviscosidade seminal é uma alteração macroscópica do sêmen, em que ele não se apresenta líquido após a degradação do coágulo seminal. Ocorre em cerca de 11%–32% dos ejaculados, mas sua etiologia e impacto sobre a fertilidade masculina ainda não estão bem entendidos. O objetivo deste estudo é avaliar a concentração de mucoproteínas e a atividade de enzimas proteolíticas em plasmas de espermatozoides com viscosidade normal (normoviscosos) e com viscosidade elevada (hiperviscosos) em amostras férteis e inférteis. Encontramos que a hiperviscosidade seminal está associada à infertilidade masculina, caracterizando-se por: diminuição significativa do volume seminal, concentração, motilidade e vitalidade de espermatozoides. Ainda, a concentração de neutrófilos se apresenta significativamente aumentada nas amostras hiperviscosas. O conteúdo mucoproteico total se apresentou reduzido nas amostras hiperviscosas, assim como nas amostras inférteis, indicando grande deficiência de componentes normais presentes no sêmen. Esses resultados sugerem que o sêmen hiperviscoso apresenta menor qualidade que o sêmen normoviscoso. Na análise proteolítica sobre caseína houve um aumento de atividade em amostras hiperviscosas férteis. Resultado semelhante foi encontrado na análise proteolítica sobre gelatina, em que as metaloproteases apresentam maior atividade em amostras de sêmen hiperviscoso e em amostras provenientes de pacientes inférteis. Analisando proteases mais específicas, como calicreínas, os resultados demonstraram que as isoformas teciduais apresentam atividade aumentada em amostras hiperviscosas, ao passo que as isoformas plasmáticas apresentam maior atividade em amostras hiperviscosas, assim como nas oriundas de pacientes inférteis. Maior atividade de proteases sugere que a hiperviscosidade seminal não é decorrente da carência da ação proteolítica sobre as proteínas do coágulo seminal. Como o aumento de enzimas proteolíticas está associado a processos inflamatórios e essas enzimas são secretadas pela próstata, nós sugerimos que pacientes com hiperviscosidade seminal apresentam inflamação na próstata.

**Palavras-chave:** Hiperviscosidade seminal, infertilidade masculina, calicreína tecidual, calicreína plasmática.

## ABSTRACT

Hyperviscous semen is a physical alteration wherein seminal plasma adheres strongly to itself after coagulum degradation. It occurs in 11%–32% of ejaculates; however, its etiology and its impact on male fertility are not well understood. The aim of this study is to evaluate mucoproteins content and to measure protease activity in seminal plasma of normoviscous and hyperviscous samples from fertile and infertile patients. We found association of hyperviscosity with seminal characteristics of infertility, showing reduced volume, sperm concentration, motility and vitality. In addition, hyperviscous semen have significant increase of neutrophils concentration. The mucoprotein content is reduced in hyperviscous and in infertile samples, indicating deficiency in seminal plasma components in these ejaculates. These results suggest that hyperviscous semen have low quality when comparing with normoviscous semen. Caseinolytic analyses showed an increased activity in fertile hyperviscous semen. A similar result was found in the gelatinolytic analyses, in which metalloproteases showed an increased activity in hyperviscous and in infertile groups. In a more specific analysis with kallikreins, the results revealed an increased activity of tissue kallikreins in hyperviscous semen, and an increased activity of plasmatic kallikrein in hyperviscous and in infertile samples. The increased protease activity suggests that hyperviscosity is not due to the lack of seminal coagulum liquefaction. Considering an increase of proteolytic enzymes is associated with inflammatory process and the proteases are secreted from the prostate, we suggest that an inflammatory process in the prostate gland is happening in the patients with hyperviscous semen.

**Keywords:** Seminal hyperviscosity, infertile men, tissue kallikrein, plasmatic kallikrein.

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Os parâmetros seminais com seus respectivos limiares estabelecidos como referência para classificação dos pacientes em férteis ou inférteis .....	13
Tabela 2: Substratos S-2302 e S-2266 utilizados nas análises de caliceínas.. .....	38
Table 1: Seminal parameters in normoviscous and hyperviscous semen.....	47
Table 2: Prevalence of fertility in the normoviscous and hyperviscous semen groups.....	48
Table 3: Seminal parameters in the four groups of study.....	48

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Proporção das influências masculinas e feminas na infertilidade do casal.....	12
Figura 2: Avaliação da viscosidade seminal através do Teste de Fio. ....	15
Figure 1: Total mucoprotein content in human seminal plasma. ....	49
Figure 2: One dimensional gel electrophoresis of human seminal plasma. ....	50
Figure 3: Caseinolytic proteinase activity in human seminal plasma .....	51
Figure 4: Zymogram of gelatinolytic activity in human seminal plasma.....	51
Figure 5: Kallikrein activity in human seminal plasma.....	52
Figure 6: Plasmatic kallikrein activity in human seminal plasma .....	52

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA: *analysis of variance*

Asp: asparagina

BCA: ácido bicinconínico

CAT: catalase

CD14: *monocyte differentiation antigen CD14*

CFTR: regulador transmembrana da fibrose cística

COX2: ciclo-oxigenase 2

DNA: Ácido desoxirribonucleico

DTT: *Dithiothreitol*

EDTA: *Ethylenediamine tetraacetic acid*

FIV: Fertilização *in vitro*

FUCA1: *tissue alpha-L-fucosidase*

GAG: glicosaminoglicanas

GHC: Grupo Hospitalar Conceição

GPX: glutationa peroxidase

GSH: glutationa

GSR: glutationa redutase

His: histidina

IU: inseminação intrauterina

kDa: quilodalton

KLK: calicreína

KLKB1: calicreína plasmática

mg/L: miligramas/Litro

MMP: metaloprotease de matriz

MUC: mucina

OMS: Organização Mundial da Saúde

PAR: receptor ativado por proteases

PCI: inibidor de proteína C

PEBP: *phosphatidylethanolamine-binding protein*

pNA: *p*-nitroanilina

PSA: antígeno prostático específico

ROS: espécies reativas de oxigênio

Ser: serina

SOD: super-óxido dismutase

SDS-PAGE: *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*

TCA: ácido tricloro acético

TCLE: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

UFC: Unidade formadora de colônia

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>10</b>
1.1	Sêmen.....	10
1.2	Infertilidade masculina.....	11
1.3	Hiperviscosidade seminal .....	13
1.4	Diagnóstico da hiperviscosidade seminal .....	14
1.5	Epidemiologia da hiperviscosidade seminal .....	15
1.6	Consequências da hiperviscosidade seminal.....	16
1.7	Hiperviscosidade seminal na reprodução assistida .....	17
1.8	Etiologia da hiperviscosidade seminal .....	18
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>26</b>
2.1	Objetivo Geral.....	26
2.2	Objetivos Específicos.....	26
<b>3</b>	<b>HIPÓTESES .....</b>	<b>27</b>
<b>4</b>	<b>MATERIAIS DE MÉTODOS .....</b>	<b>28</b>
4.1	Delineamento .....	28
4.2	Aspectos éticos.....	28
4.3	Coleta e análise seminal .....	28
4.4	Classificação dos grupos .....	29
4.5	Quantificação proteica e formação dos pools .....	29
4.6	Quantificação de mucoproteínas totais .....	31
4.7	Eletroforese SDS-PAGE de gradiente .....	32
4.8	Análise de atividade enzimática proteolítica: atividade caseinolítica.....	33
4.9	Análise de atividade enzimática proteolítica: atividade gelatinolítica .....	35
4.10	Análise de atividade enzimática de calicreínas .....	37
4.11	Análise estatística .....	38
<b>5</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>39</b>
	<b>SUMMARY .....</b>	<b>40</b>
	<b>INTRODUCTION .....</b>	<b>41</b>
	<b>MATERIALS AND METHODS.....</b>	<b>43</b>
	Ethical approval .....	43
	Semen samples analysis .....	43
	Study design.....	43



Total protein concentration and pools.....	44
Total mucoprotein quantification.....	44
Gradient SDS-PAGE electroforesis.....	45
Assay for azocaseinolytic activity.....	45
Assay for gelatinolytic activity.....	46
Assay for kallilrein activity.....	46
Statistical analysis.....	47
<b>RESULTS.....</b>	<b>47</b>
Seminal analysis.....	47
Study samples and protein concentration.....	48
Mucoprotein.....	49
Caseinolytic and gelatinolytic activities.....	50
Kallikrein activity.....	52
<b>DISCUSSION.....</b>	<b>53</b>
<b>CONCLUSION.....</b>	<b>57</b>
<b>ACKNOWLEDGMENTS.....</b>	<b>57</b>
<b>REFERENCES.....</b>	<b>57</b>
<b>6 DISCUSSÃO.....</b>	<b>61</b>
6.1 Análise seminal.....	61
6.2 Mucoproteínas.....	62
6.3 Proteases.....	65
6.4 Patologias da próstata.....	73
<b>7 CONCLUSÃO.....</b>	<b>75</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>76</b>

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 Sêmen

O sêmen humano é uma secreção produzida pelo trato reprodutor masculino e é constituído por células e plasma seminal. O principal componente celular é o espermatozoide, que é o gameta masculino. É produzido nos testículos e estocado nos epidídimos até o momento da ejaculação e normalmente representa mais de 95% das células presentes no esperma. Outros tipos celulares encontrados são células imunológicas, células germinativas, células epiteliais e microrganismos (DU PLESSIS; GOKUL; AGARWAL, 2013; JUYENA; STELLETTA, 2012; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010)

Já o plasma seminal representa mais e 95% do volume do sêmen e é constituído pela mistura de secreções provenientes das vesículas seminais (~60% do volume seminal), próstata (~30%), glândulas bulbouretrais (~5%), epidídimos e testículos (~5%). O plasma seminal tem a função de controlar o metabolismo dos espermatozoides e de fornecer um ambiente que suporte a viabilidade dos espermatozoides ao longo dos tratos reprodutores masculino e feminino. (ANDRADE-ROCHA, 2005; DU PLESSIS; GOKUL; AGARWAL, 2013; INTASQUI et al., 2015; JUYENA; STELLETTA, 2012; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010)

Várias moléculas do plasma seminal controlam o metabolismo dos espermatozoides. As mais conhecidas delas são proteínas seminogelinas e seus derivados. As seminogelinas, quando íntegras, inibem motilidade e os processos de capacitação espermática. Já os produtos de degradação das seminogelinas agem nos processos inversos, induzindo vias metabólicas que levam ao aumento de motilidade e a capacitação espermática (ANDRADE-ROCHA, 2005; DE LAMIRANDE, 2007)

Para manter a qualidade dos espermatozoides, o plasma seminal apresenta moléculas de nutrição, de defesa imunológica e de defesa antioxidante. O plasma é rico em frutose, que é secretada pelas glândulas vesiculares e que formam a principal fonte de moléculas utilizadas para a produção de energia nos espermatozoides. Várias substâncias também apresentam atividade antimicrobiana e protegem os espermatozoides de agentes patogênicos que podem estar presentes nos tratos reprodutores masculino e feminino. Algumas moléculas já identificadas são: espermicina, lisozima, lactoferrina, produtos de degradação das seminogelinas (ANDRADE-ROCHA, 2005; SOTIROPOULOU; PAMPALAKIS, 2010)

Espécies reativas de oxigênio são formadas a partir do metabolismo aeróbico dos espermatozoides e, principalmente, dos neutrófilos. O desequilíbrio entre agentes oxidantes e antioxidantes gera o estresse oxidativo que resulta em danos nas membranas celulares dos espermatozoides devido à presença de ácidos graxos poli-insaturados. Danos nas membranas prejudicam motilidade, vitalidade e capacidade fecundante dos espermatozoides. O estresse oxidativo também pode causar danos na integridade do DNA espermático, resultando em falha de desenvolvimento embrionário. Durante a espermatogênese, os espermatozoides perdem grande parte da capacidade antioxidante citoplasmática em decorrência da perda de grande parte do citoplasma. Assim, eles ficam dependentes da ação de antioxidantes presentes no plasma seminal. O plasma seminal é rico em diversas moléculas antioxidantes enzimáticas e não enzimáticas. Os constituintes enzimáticos representam: superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e sistema glutatona peroxidase/reductase (GPX/GSR). Constituintes não enzimáticos incluem: glutatona (GSH), vitaminas C e,  $Zn^{2+}$  e diversos aminoácidos e proteínas. (AGARWAL et al., 2014; LAYALI et al., 2015; SICILIANO et al., 2001)

## **1.2 Infertilidade Masculina**

Estima-se que até 20% dos casais tenham dificuldades para engravidar. Atualmente, sabe-se que o homem tem participação conhecida na infertilidade de cerca 50% desses casais (Figura 1). Infertilidade masculina é decorrente de disfunção do sistema reprodutor masculino, que resulta nos problemas de produção dos gametas masculinos, de produção das secreções ou de transporte dos gametas e secreções ao longo do trato reprodutor masculino. Entretanto, ainda se entende pouco quais são os mecanismos moleculares que resultam nesses problemas. (ANDROLOGY AUSTRALIA, 2014; PFEIFER et al., 2015; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010)

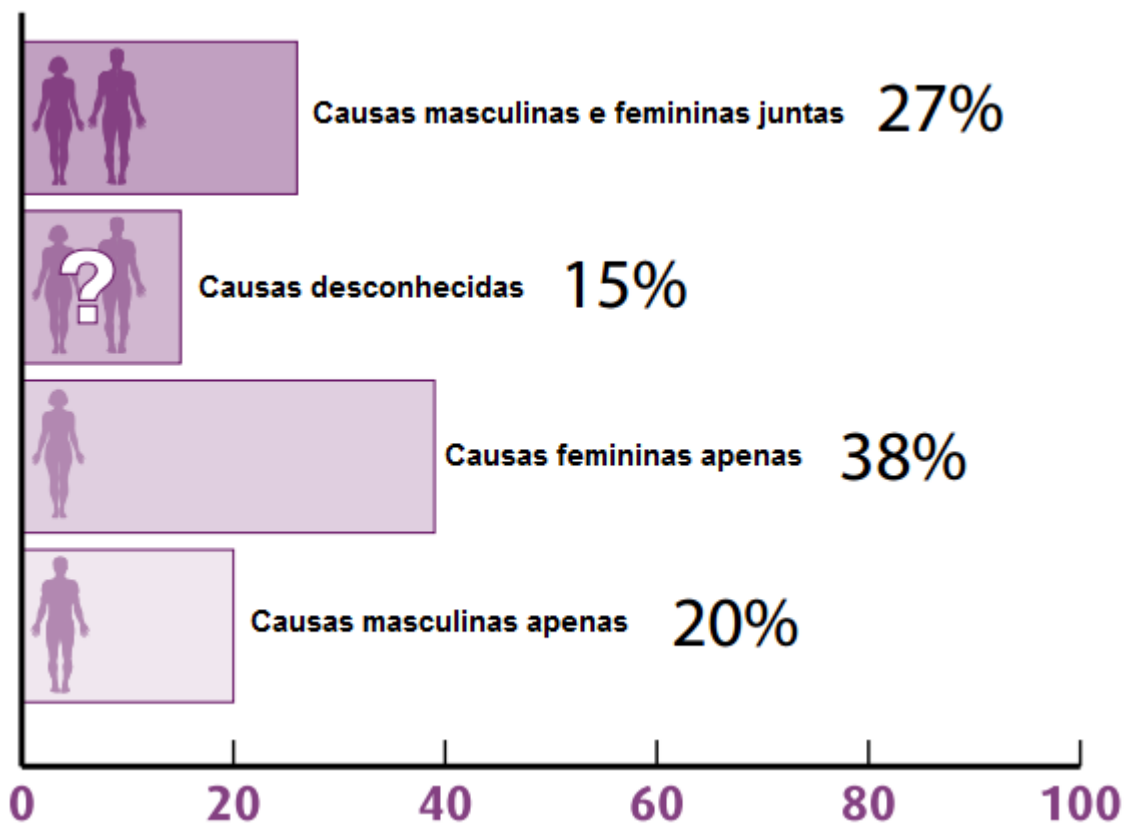


Figura 1. Proporção das influências masculinas e femininas na infertilidade dos casais inférteis. (ANDROLOGY AUSTRALIA, 2014)

A primeira etapa de investigação da infertilidade masculina é o desenvolvimento da análise do sêmen, o espermograma. Nesse exame, parâmetros seminais que informam sobre a produção de espermatozoides nos testículos, a secreção das glândulas sexuais e a integridades dos dutos que transportam espermatozoides e secreções são avaliados. (ANDROLOGY AUSTRALIA, 2014; PFEIFER et al., 2015; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010)

Os parâmetros seminais são:

- Coagulação/liquefação, viscosidade, volume, pH, cor, e turbidez espermáticos (parâmetros macroscópicos);
- Quantidade total de espermatozoides no ejaculado, concentração, motilidade, morfologia e vitalidade dos espermatozoides, concentração de neutrófilos (parâmetros microscópicos).

Análises adicionais podem ser realizadas na amostra seminal, como testes imunológicos, microbiológicos e de biomarcadores.

O Manual de Examinação e Processamento do Sêmen Humano da Organização Mundial da Saúde (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010) é a principal referência para o desenvolvimento da análise seminal e diagnóstico de fertilidade. Com base em pesquisas

sobre infertilidade masculina, o Manual estabelece apenas seis parâmetros, sobre os quais se apresentam informações bibliográficas suficientes para os elencarem como discriminantes no diagnóstico da fertilidade. Pacientes que apresentam um ou mais desses seis parâmetros com valores inferiores aos dos limiares estabelecidos, são considerados inférteis. Tabela 1 (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010)

Tabela 1. Os parâmetros seminais, com seus respectivos limiares estabelecidos como referência para classificação dos pacientes em férteis ou inférteis, de acordo com o Manual de Exame e Processamento de Sêmen Humano da Organização Mundial da Saúde, 5ª Ed. (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010)

<b>Parâmetro Seminal</b>	<b>Valor mínimo de referência</b>
Volume seminal	1,5 mL
Espermatozoides totais no ejaculado	39 x 10 <sup>6</sup>
Concentração de espermatozoides	15 x 10 <sup>6</sup> / mL
Motilidade total (progressivos + não progressivos)	40 %
Motilidade progressiva	32 %
Vitalidade	58 %
Morfologia normal	4 %

Como a análise seminal informa sobre as condições do trato reprodutor masculino, ela também é utilizada para obter informações clínicas a respeito de outros problemas que podem acometer o sistema. Em especial, é utilizado para informações a respeito de infecções, hiperplasia de próstata e câncer de próstata. (ANDRADE-ROCHA, 2005)

### **1.3 Hiperviscosidade seminal**

Os diferentes componentes do sêmen (espermatozoides e as várias secreções) apenas entram em contato entre si na ejaculação. Um dos primeiros resultados dessa mistura é a formação do coágulo seminal para permitir a deposição do sêmen na região posterior da cavidade vaginal. O coágulo seminal é formado pela agregação de proteínas secretadas pelas vesículas seminais, em decorrência da interação dessas proteínas com íons de Zn<sup>2+</sup> prostático. As principais proteínas envolvidas são as seminogelinas I e II, que são as proteínas mais abundantes do sêmen e representam cerca de 50% do conteúdo proteico. Algumas funções do

coágulo sobre os espermatozoides: imobiliza os espermatozoides e inibe a capacitação espermática prematura. (DE LAMIRANDE, 2007; EMAMI et al., 2009; ESFANDIARI et al., 2014; SUZUKI et al., 2007)

Dentro de um período de até 60 minutos, o coágulo é liquefeito na maior parte das amostras seminais. Algumas amostras apresentam uma liquefação tardia (superior a 60 min), cuja etiologia é desconhecida. A liquefação seminal é decorrente da ação de proteases que hidrolisam as proteínas do coágulo a peptídeos. Várias proteases da família calicreína (KLK) participam desse processo. A principal delas é a calicreína 3 (KLK3), também chamada de antígeno prostático específico (PSA), que é secretada pela próstata sob a influência de androgênios e outros fatores. A liquefação do sêmen resulta na libertação dos espermatozoides e na ativação de processos que induzem motilidade e capacitação espermática. (ANDRADE-ROCHA, 2005; DE LAMIRANDE, 2007; KALINSKA et al., 2016; SUZUKI et al., 2007; VEVERIS-LOWE et al., 2007)

Após a liquefação, o sêmen apresenta-se como um líquido homogêneo de baixa viscosidade. Entretanto, em alguns casos, o sêmen se apresenta como um líquido semigelatinoso após essa liquefação do coágulo, cuja consistência não diminui com o passar do tempo. A essa característica, denomina-se hiperviscosidade seminal. (DU PLESSIS; GOKUL; AGARWAL, 2013; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010)

#### **1.4 Diagnóstico da Hiperviscosidade Seminal**

Hiperviscosidade é um parâmetro avaliado no espermograma de rotina nos laboratórios de infertilidade através do Teste do Fio Seminal. O sêmen hiperviscoso caracteriza-se por se aderir fortemente em si mesmo quando se é feito a tentativa de pipetá-lo. Assim, a análise para a detecção da hiperviscosidade é feita através da pipetagem do sêmen: aspira-se o sêmen liquefeito com uma pipeta e pipeta-o. Amostras com viscosidade normal gotejam ao sair da pipeta, enquanto amostras hiperviscosas formam um fio seminal. Figura 2. Alternativamente, o teste pode ser realizado com uma haste de vidro que é introduzida e retirada da amostra. Em amostras de viscosidade normal, o sêmen não fica aderido à haste; já amostras hiperviscosas, aderem à haste formando um fio seminal. (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010) Essa análise é qualitativa e é estabelecido um limiar de 2 cm do fio seminal para a amostra ser classificada como hiperviscosa. As amostras hiperviscosas ainda podem ser subclassificadas

como suave (fio seminal de 2-4cm), moderada (4-6cm) ou grave (> 6 cm). (ELIA et al., 2009; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010)

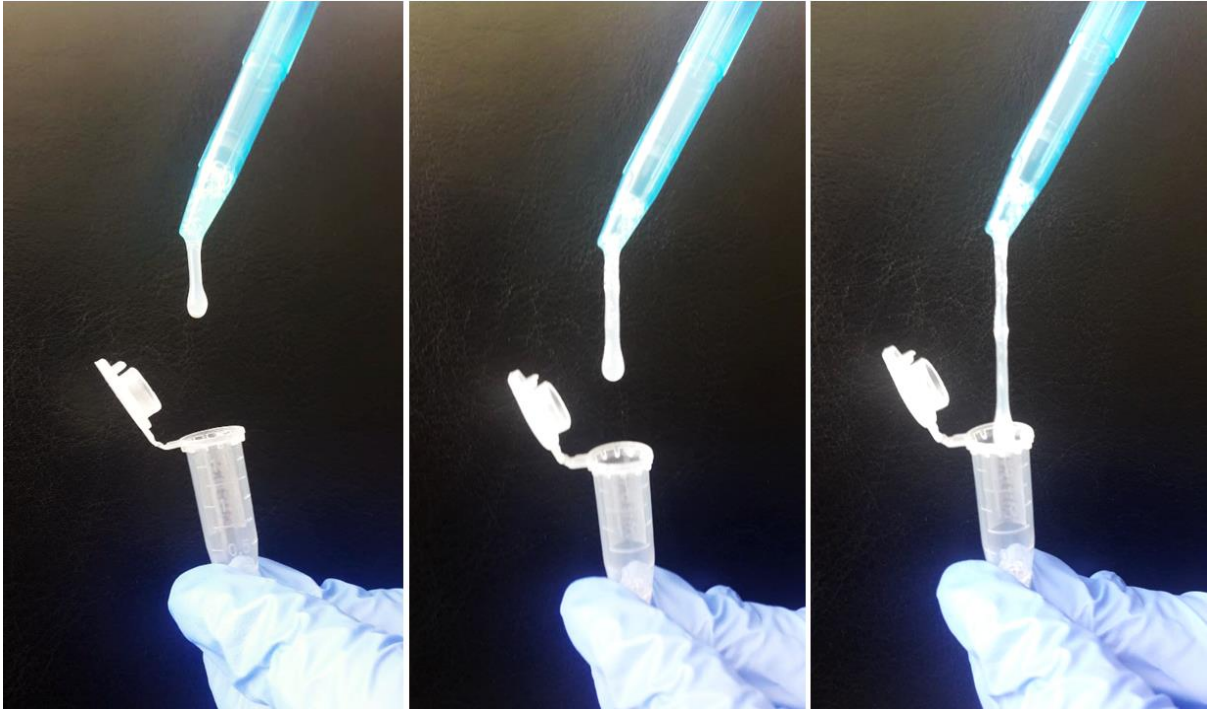


Figura 2. Avaliação da viscosidade seminal através do Teste de Fio. Amostra seminal liquefeita é aspirada e pipetada. Sêmen normoviscoso goteja; sêmen hiperviscoso forma um fio seminal ao ser pipetado. Na foto, amostra hiperviscosa analisada após incubação por 7 h a 37 °C, evidenciando que a hiperviscosidade não se altera com o tempo.

### 1.5 Epidemiologia da Hiperviscosidade Seminal

Andrade-Rocha, analisando 2650 espermogramas para investigação da infertilidade ou para investigação de problemas urológicos em homens com até 55 anos, encontrou que a hiperviscosidade é uma das alterações dos parâmetros seminais macroscópicos mais frequentemente encontrado, ocorrendo em 29% dos pacientes. (ANDRADE-ROCHA, 2005)

Em estudos exclusivos com pacientes que realizaram espermograma para investigação da infertilidade ou para uso do sêmen nas técnicas de reprodução assistida, a epidemiologia da hiperviscosidade seminal variou de 11-32%. (ELIA et al., 2009; ELZANATY; RICHTHOFF; GIWERCMAN, 2004; GONZALES; KORTEBANI; MAZZOLLI, 1993; GOPALKRISHNAN; PADWAL; BALAIAH, 2000)

## 1.6 Consequências da Hiperviscosidade Seminal na Fertilidade

O impacto da hiperviscosidade na fertilidade ainda é pouco entendido. O Manual da Organização Mundial da Saúde (OMS) não considera como um fator de infertilidade; entretanto, vários autores têm sugerido que seja um fator contribuinte para a infertilidade masculina, em decorrência da sua frequência em pacientes considerados inférteis e sua associação com baixa motilidade dos espermatozoides. Com relação à baixa motilidade, inicialmente acreditava-se que era decorrente da maior resistência encontrada pelos espermatozoides num meio de maior viscosidade. Contudo, quando a viscosidade é reduzida *in vitro*, os espermatozoides continuam apresentando menor motilidade, sugerindo que fatores químicos estão envolvidos na limitação de movimento dos espermatozoides presentes nas amostras hiperviscosas. Vários autores acreditam que a menor motilidade desses gametas prejudique na sua movimentação dentro do sistema reprodutor feminino, resultando em infertilidade. (DAW et al., 2011; DU PLESSIS; GOKUL; AGARWAL, 2013; ESFANDIARI et al., 2008, 2014; GONZALES; KORTEBANI; MAZZOLLI, 1993; GOPALKRISHNAN; PADWAL; BALAIAH, 2000; LAYALI et al., 2015; ROSSI et al., 2004; SICILIANO et al., 2001)

Com relação aos demais parâmetros seminais, alguns autores também encontram que outros parâmetros estão prejudicados em espermas com viscosidade aumentada. Todavia, não há um consenso entre os estudos, com diferentes características seminais sendo relatadas como associadas à hiperviscosidade. (DAW et al., 2011; ESFANDIARI et al., 2008, 2014; GONZALES; KORTEBANI; MAZZOLLI, 1993; GOPALKRISHNAN; PADWAL; BALAIAH, 2000; LAYALI et al., 2015; SICILIANO et al., 2001)

Há três estudos que analisaram a integridade do DNA em amostras hiperviscosas. Dois grupos encontraram que o nível de fragmentação de DNA em amostras hiperviscosas se assemelha ao encontrado nas amostras normoviscosas, não indicando associação da hiperviscosidade com danos no DNA. Na contramão desses resultados, Gopalkrishnan *et al* encontraram que a cromatina nos espermatozoides de amostras de viscosidade elevada apresenta integridade significativamente reduzida. (ESFANDIARI et al., 2014; GOPALKRISHNAN; PADWAL; BALAIAH, 2000; KUSSLER et al., 2014).

Além das alterações nos parâmetros seminais, sugere-se ainda que a hiperviscosidade perturbe a ação normal das moléculas presentes no plasma seminal. Por exemplo, a alta viscosidade previne a homogeneização dos crioprotetores no esperma e suas interações com os espermatozoides, resultando em baixíssima vitalidade dos espermatozoides de amostras



hiperviscosas após a criopreservação, quando comparado com espermatozoides de viscosidade normal. (KERSHAW-YOUNG; MAXWELL, 2012) Assim, acredita-se que o meio hiperviscoso também interfira negativamente na distribuição e função das diversas moléculas do plasma seminal, prejudicando a capacitação espermática, proteção contra danos oxidativos, captação de frutose, etc. Esse quadro resultaria em espermatozoides de menor qualidade e menos aptos para a fertilização. (DU PLESSIS; GOKUL; AGARWAL, 2013; ESFANDIARI et al., 2008; MENDELUK et al., 2000)

### **1.7 Hiperviscosidade Seminal na Reprodução Assistida**

Essa elevação da viscosidade interfere na correta avaliação das amostras no espermograma e dificulta o manuseio e o adequado processamento do sêmen para o desenvolvimento das técnicas de reprodução assistida. Dessa maneira, espermatozoides hiperviscosos têm que ser tratados para redução da viscosidade antes de manipulados. (BEHR et al., 2009; KERSHAW-YOUNG; EVANS; MAXWELL, 2012; KERSHAW-YOUNG; MAXWELL, 2012; KUSSLER et al., 2014; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010)

O Manual da OMS propõe três diferentes métodos, que são os mesmos sugeridos para tratar amostras não liquefeitas de sêmen. São eles: completa diluição do sêmen em meio fisiológico (1:1); passagem do sêmen em uma agulha calibre 18-19G por cerca de 6-10 vezes; ou incubação do sêmen com a enzima de amplo espectro bromelina (5 IU/ml) por 10 min a 37 °C. (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010)

Além da bromelina, outros agentes químicos já foram utilizados em sêmen humano para desfazer a hiperviscosidade seminal:  $\alpha$ -amilase,  $\alpha$ -quimotripsina, tripsina, plasmina, dornase pancreática, esputolisina, n-acetil cisteína. O mais sugerido e utilizado dessas enzimas por autores para desfazer essa hiperviscosidade tem sido a proteinase  $\alpha$ -quimotripsina, devido a sua eficiência e maior segurança. (AVENDAÑO et al., 2013; CLARKE, 1982; DAW et al., 2011; EMAMI et al., 2009; MENDELUK et al., 2000) Em animais, já foram utilizadas as seguintes enzimas: tripsina, fibrinolisinase, hialuronidase, amilase e colagenase. Dessas, a colagenase é considerada a mais eficiente e mais segura para o uso em animal. (BEHR et al., 2009; BRAVO et al., 2013; CARRETERO et al., 2012; GIULIANO et al., 2010)

Além de diminuir a viscosidade seminal, alguns estudos encontram que esses tratamentos podem trazer benefícios ao sêmen, como melhorar a motilidade dos espermatozoides. Além disso, a diminuição da viscosidade aumenta o sucesso da

criopreservação seminal. A alta viscosidade previne a homogeneização dos crioprotetores no espermatozoide e suas interações com os espermatozoides; tornando extremamente baixo o sucesso das técnicas de reprodução assistida com material hiperviscoso criopreservado que não teve a viscosidade diminuída previamente à criopreservação. (DAW et al., 2011; ELIA et al., 2009; GIULIANO et al., 2010; KERSHAW-YOUNG; MAXWELL, 2012)

Entretanto, há também estudos que perceberam efeitos danosos nos espermatozoides quando são passados pela agulha ou incubados com enzimas. Kussler *et al* encontraram que a passagem do sêmen pela agulha causa um pequeno aumento na fragmentação de DNA total dos espermatozoides (3,8% para 6,3%). Autores que analisaram a segurança das diversas enzimas utilizadas relatam que existe um limiar tênue entre efeitos benéficos nos parâmetros seminais (aumento de motilidade) e efeitos maléficos (diminuição da motilidade e da vitalidade); e recomendam que o uso de enzimas deve ser feito seguindo protocolos estritos. O Manual da OMS adverte que o uso da bromelina pode afetar a morfologia e a motilidade dos espermatozoides, assim como a bioquímica do plasma seminal. Assim, alguns autores questionam a segurança desses tratamentos. (BRAVO; CCALLO; GARNICA, 2000; ELIA et al., 2009; KUSSLER et al., 2014)

Com relação ao uso de sêmen hiperviscoso em técnicas de reprodução assistida, há somente três estudos. Os dois estudos com inseminação intrauterina (IIU) encontraram que a taxa de gravidez em IIU é semelhante entre casais com espermatozoide hiperviscoso ou com viscosidade normal. Entretanto, ao acompanhar a gravidez das pacientes, Esfandiari *et al* encontraram que a taxa de abortos é maior nos casais que utilizaram sêmen hiperviscoso, reduzindo o sucesso final do tratamento por IIU nessas pacientes. (DAW et al., 2011; ESFANDIARI; GOTLIEB; CASPER, 2006) No único estudo com Fertilização *in vitro* (FIV), foi encontrado que as taxas de fertilização e de gravidez clínica são menores no grupo de pacientes que utilizou espermatozoides de amostras hiperviscosas. (ESFANDIARI et al., 2008) Esses resultados indicam que, em ambos os tratamentos (IIU e FIV), a alteração da viscosidade seminal contribui negativamente para o sucesso das técnicas de reprodução assistida, resultando em menores taxas de nascidos no final dos tratamentos.

## **1.8 Etiologia da Hiperviscosidade Seminal**

A etiologia da hiperviscosidade seminal ainda não foi elucidada. Algumas condições têm sido sugeridas como fatores causantes ou associados à hiperviscosidade seminal, sendo

eles: alteração de biomarcadores dos órgãos do trato reprodutor; inflamação/infecção do trato reprodutor masculino; estresse oxidativo no sêmen; mutações genéticas; excesso oligoproteico no sêmen; redução de proteases seminais.

### 1.8.1 – Biomarcadores dos órgãos do trato reprodutor

Frutose e fósforo são utilizados como biomarcadores de vesículas seminais;  $Zn^{+2}$ ,  $Ca^{+2}$  e fosfatase ácida, como biomarcadores de próstata; e  $\alpha$ -glucosidase, como biomarcador de epidídimo. (ANDRADE-ROCHA, 2005; CARPINO; SICILIANO, 1998; ELZANATY; RICHTHOFF; GIWERCMAN, 2004; GONZALES; KORTEBANI; MAZZOLLI, 1993; SICILIANO et al., 2001). Três estudos encontraram menor concentração de biomarcadores das glândulas sexuais em pacientes com hiperviscosidade seminal e os autores propõem que a hiperviscosidade está associada com disfunção das glândulas do trato reprodutor masculino (ANDRADE-ROCHA, 2005; ELZANATY; RICHTHOFF; GIWERCMAN, 2004; GONZALES; KORTEBANI; MAZZOLLI, 1993). Andrade-Rocha, salienta que uma menor concentração de  $Zn^{+2}$  deve estar alterando a atividade proteolítica das enzimas presentes no sêmen ( $Zn^{+2}$  age regulando a atividade de diversas enzimas secretadas pelas vesículas seminais), o que poderia estar envolvido na etiologia da hiperviscosidade seminal (ANDRADE-ROCHA, 2005). Além disso, essas disfunções glandulares estariam resultando na concentração de vários constituintes plasmáticos fora do ideal no plasma seminal, prejudicando a qualidade dos espermatozoides para a fertilização (GONZALES; KORTEBANI; MAZZOLLI, 1993). Embora, outros três estudos não tenham corroborado esses achados, os estudos que acharam diferença na composição de biomarcadores apresentam número amostral amplo, que pode ter dado mais poder nas análises comparativas. Andrade-Rocha, por exemplo, analisou amostras de 2650 pacientes. (ANDRADE-ROCHA, 2005; CARPINO; SICILIANO, 1998; FRENETTE; TREMBLAY; DUBÉ, 1989; SICILIANO et al., 2001).

### 1.8.2 - Inflamação/Infecção do Trato Reprodutor

Os leucócitos são considerados indicadores de inflamação no trato reprodutor masculino. De acordo com o Manual da OMS, concentrações superiores a  $1 \times 10^6$  neutrófilos/mL inferem inflamação no trato reprodutor masculino. A relação entre leucospermia e hiperviscosidade seminal tem resultados contraditórios, com grupos

encontrando associação (FLINT; DU PLESSIS; MENKVELD, 2014; LA VIGNERA et al., 2012), enquanto outros autores encontraram concentrações normais de neutrófilos em amostras hiperviscosas (KUSSLER et al., 2014; MENDELUK, 1999; SICILIANO et al., 2001)

Dois estudos com análises microbiológicas no sêmen hiperviscoso também têm resultados divergentes. Enquanto um grupo encontrou resultado positivo entre hiperviscosidade e infecção (decorrente do elevado número de colônias bacterianas em sêmen hiperviscoso), o outro grupo não achou essa diferença. (MENDELUK, 1999; WANG, 2006)

Elia *et al* encontraram que pacientes que apresentavam hiperviscosidade e infecção no trato genital, quando têm os problemas de infecção solucionados em decorrência do uso de antibióticos e anti-inflamatórios, a viscosidade elevada também é solucionada em 100% dos casos. Porém, esse tratamento não apresenta eficácia na hiperviscosidade em pacientes que apresentavam hiperviscosidade sem o quadro de infecção, mesmo quando os pacientes apresentam inflamação em alguma glândula sexual. Os autores sugerem que infecção do sistema reprodutor pode ser um fator causante de hiperviscosidade num cenário específico de hiperviscosidade seminal, e que outros casos de hiperviscosidade são decorrentes de outras causas (ELIA et al., 2009).

### 1.8.3 - Estresse Oxidativo

O plasma seminal é rico em substâncias antioxidantes que compensam a carência de agentes antioxidantes intracelulares nos espermatozoides, decorrente da perda citoplasmática durante a espermatogênese. Substâncias antioxidantes plasmáticas incluem: as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e sistema glutathiona peroxidase/reductase (GPX/GSR). Constituintes não enzimáticos incluem: glutathiona (GSH), vitaminas C e E,  $Zn^{2+}$  e diversos aminoácidos e proteínas. (AGARWAL et al., 2014; FUJII; IMAI, 2014; LAYALI et al., 2015; SICILIANO et al., 2001)

Os estudos que analisaram estresse oxidativo em plasmas hiperviscosos encontraram que estresse oxidativo está associado com o quadro da elevação da viscosidade seminal. Plasmas hiperviscosos apresentam menores capacidades antioxidantes enzimáticas e não enzimáticas que os plasmas normoviscosos. Sugerem que a carência da capacidade antioxidante plasmática resulta em oxidações proteica e lipídica, que contribuiriam para o aumento da viscosidade seminal, provavelmente, alterando as interações intermoleculares dos constituintes plasmáticos. Estresse oxidativo também pode causar danos na membrana

plasmática dos espermatozoides e, possivelmente, danos citoplasmáticos e nucleares. Assim, é possível que os espermatozoides de amostras hiperviscosas tenham menor qualidade para a fertilização. (AYDEMIR et al., 2008; LAYALI et al., 2015; SICILIANO et al., 2001) O mecanismo que leva a depleção antioxidante não é conhecido. Um dos estudos sugere que possa ser decorrente do excesso de leucócitos, células imaturas e espermatozoides anormais, que geralmente são relatados aumentados em amostras hiperviscosas e que são as três principais fontes de espécies reativas de oxigênio (ROS) no sêmen. (LAYALI et al., 2015) Diminuição da capacidade antioxidante e estresse oxidativo no sêmen são observados em pacientes com varicocele ou com inflamações em órgãos do sistema reprodutor, decorrente de infecções ou outras patologias. (AGARWAL et al., 2014; FUJII; IMAI, 2014) Mais investigações são necessárias para se descobrir o que causa a diminuição da capacidade antioxidante e o seu papel na etiologia dos sêmens hiperviscosos.

#### 1.8.4 - Fator Genético

O gene CFTR (regulador transmembrana da fibrose cística) é uma proteína transmembrana que participa da secreção de eletrólitos e água. Mutações genéticas no gene CRTR estão relacionadas com alterações de viscosidade de secreções corporais. Uma vez que CFTR é expresso no trato reprodutor masculino, Rossi *et al* analisaram se a hiperviscosidade seminal está relacionada com mutações nas regiões polimórficas do gene mais envolvidas com patologias: T e TG. As frequências das variações T<sub>5</sub> e TG<sub>12</sub> nos pacientes hiperviscosos são maiores do que as encontradas em pacientes normoviscosos, assim como da população em geral; e essas frequências são próximas das encontradas em homens com fibrose cística, que são inférteis devido à ausência congênita bilateral de vasos deferentes. Os autores concluem que essas e outras variações no gene do CFTR podem constituir a base genética da hiperviscosidade seminal. O genótipo T<sub>5</sub> e TG<sub>12</sub> poderia reduzir a função da proteína CFTR, gerando alteração na secreção de eletrólitos e água no trato reprodutor masculino e resultar na hiperviscosidade plasmática, que seria proporcional à frequência dessas variações em cada paciente (ROSSI et al., 2004). Até o momento, não há outros estudos que buscam entender as causas genéticas da hiperviscosidade seminal.

#### 1.8.5 – Componente oligoproteico

Estudos já mostram que não há associação entre hiperviscosidade e concentração de proteínas totais e concentração de DNA total no sêmen. (CARPINO; SICILIANO, 1998; MENDELUK et al., 2000)

Em camelídeos, alguns autores pesquisaram glicosaminoglicanas (GAGs) podem ser a causa da hiperviscosidade, já que as GAGs estão relacionadas com viscosidade em algumas secreções exócrinas. Esses estudos encontraram que a GAG queratan sulfato apresenta uma maior concentração nas amostras hiperviscosas nesses animais. Entretanto, o tratamento do sêmen com enzimas que degradam GAGs não reduz a hiperviscosidade seminal. Assim, os autores sugerem que GAGs provavelmente não são a causa do aumento da hiperviscosidade seminal em camelídeos (KERSHAW-YOUNG; EVANS; MAXWELL, 2012; KERSHAW-YOUNG; MAXWELL, 2012)

Por outro lado, várias enzimas proteolíticas já foram descritas na literatura por terem a capacidade de reduzir a viscosidade seminal, tanto em seres humanos, como em animais, sugerindo que o quadro de hiperviscosidade possa ter a participação de proteínas específicas. Mendeluk *et al*, ao perceberem que tripsina, DTT e  $\alpha$ -amilase reduzem a viscosidade seminal humana, sugerem que proteínas glicosiladas estão envolvidas na característica da viscosidade do fluido. Podendo, inclusive, estar ocorrendo a formação de complexos oligoproteicos decorrente de interações moleculares diferenciadas no plasma seminal hiperviscoso. (MENDELUK et al., 2000)

Em alpacas e lhamas, o sêmen já é considerado hiperviscoso quando o fio seminal é superior a 0,5 cm, pois já dificulta a manipulação seminal. Assim, em torno de 60% das amostras seminais desses animais são consideradas hiperviscosas. (BRAVO et al., 1999; MOSCOSO, 2002) Nesses animais, um estudo indicou que quando os animais com hiperviscosidade seminal são submetidos à remoção das glândulas bulbouretrais, passavam a não apresentar mais o quadro de sêmen hiperviscoso. A análise por géis SDS-PAGE (*sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) entre as amostras indicou a ausência de 8 bandas nas amostras após a remoção das glândulas bulbouretrais com tamanhos de 49-254 kDa, indicando a grande mudança de composição que ocorre na carência dessas glândulas. (APICHELA et al., 2014) Além disso, quando espermatozoides são coletados no epidídimo desses animais, não há presença de secreção hiperviscosa, sugerindo que a hiperviscosidade não tem origem testicular ou epididimal nesses animais. (MORTON et al., 2010) Um estudo de proteômica no plasma seminal, identificou a presença de 89 proteínas, das quais quatro apresentam diferentes abundâncias entre as amostras hiperviscosas e de viscosidade normal. CD14 (monocyte differentiation antigen CD14), PEBP (phosphatidylethanolamine-binding

protein) e FUCA1 (tissue alpha-L-fucosidase) estão em concentrações reduzidas quase que pela metade nas amostras hiperviscosas; enquanto que Mucina 5B se apresenta cerca de cinco vezes mais abundante em amostras hiperviscosas. (KERSHAW-YOUNG; MAXWELL, 2012) Mucina 5B é uma mucoproteína (glicoproteína altamente glicosilada) formadora de gel, que está presente nas glândulas bulbouretrais e nos sêmens desses camelídeos, assim como nas glândulas bulbouretrais e sêmens dos seres humanos. Kershaw-Young *et al* concluem que é bastante provável que a hiperviscosidade seminal de alpacas e lhamas seja atribuída à maior concentração de Mucina 5B no plasma seminal. (KERSHAW-YOUNG; MAXWELL, 2012)

Em rinocerontes, sêmens de viscosidade normal e aumentada, assim como biopsias de próstata, glândulas vesiculares e glândulas bulbouretrais, foram analisadas por géis SDS-PAGE 2D. As análises detectaram uma banda superior a 250 kDa e  $pI < 3$  nas amostras hiperviscosas, cuja intensidade aumentava proporcionalmente com a hiperviscosidade seminal; a mesma banda foi detectada nas análises de glândulas bulbouretrais. O tratamento para diminuição da viscosidade seminal com as enzimas  $\alpha$ -amilase e colagenase resultou na diminuição da viscosidade e da detecção da banda, que desaparece completamente quando o sêmen é incubado com concentrações de 0.3 IU/ $\mu$ L de  $\alpha$ -amilase ou 0.6 IU/ $\mu$ L de colagenase. Os autores não conseguiram identificar a proteína e sugeriram que se trata de uma glicoproteína secretada pelas glândulas bulbouretrais e que está envolvida no aumento da viscosidade em sêmens de rinocerontes. (BEHR et al., 2009)

Até o momento, o único estudo de perfil proteico em seres humanos, analisou sêmens humanos hiperviscosos e de viscosidade por gel SDS-PAGE para extensão de 10 a 100 kDa e encontrou distribuição de bandas similares. Todavia, além de restringir a análise para proteínas inferiores a 100 kDa, essa técnica utilizada no estudo não é sensível para detectar diferenças individuais na composição proteica. (CARPINO; SICILIANO, 1998)

#### 1.8.6 – Calicreínas (KLKs)

Calicreínas (do grego pâncreas, onde foram isoladas pela primeira vez) são duas famílias de serino proteases constituídas por 16 enzimas, a saber: a calicreína plasmática (KLKB1), a calicreína tecidual (KLK1) e calicreínas 2 a 15 (KLK 2-15). KLKB1 e KLK1 formam o sistema calicreína-cinina, pois uma de suas propriedades é clivar moléculas de cininogênio, produzindo cininas, que são peptídeos envolvidos na indução de resposta inflamatória. KLKs 2 a 15 não apresentam essa atividade cininogênica e, por isso, formam o

sistema de peptídeos relacionados a calicreína. (GAO et al., 2010; KALINSKA et al., 2016; LUNDWALL; BRATTSAND, 2008)

No trato reprodutor masculino e no sêmen estão presentes KLKB1, KLK1 e 10 peptídeos relacionados a calicreínas (KLK 2,3,5,6,7,8,10,11,13 e 14). Essas enzimas são sintetizadas na próstata e nos testículos, e são secretadas para o plasma seminal a partir da próstata. Dessas, a mais estudada é a KLK3, pois é utilizado como biomarcador de câncer de próstata e, por isso, também é chamada de antígeno prostático específico (PSA). Sua função no sêmen é degradar as proteínas que formam o coágulo seminal, resultando na liquefação do sêmen. (EMAMI et al., 2009; ESFANDIARI et al., 2014; LUNDWALL; BRATTSAND, 2008; VEVERIS-LOWE et al., 2007)

Dois estudos mensuraram a concentração de KLK3 em amostras normoviscosas e hiperviscosas e encontraram que a concentração da enzima é similar entre os grupos. (DUBK; GAUDREAU; TREMBLAY, 1989; EMAMI et al., 2009) Esfandiari et al mensurou o nível de degradação das seminogelinas em plasmas normoviscosos e hiperviscosos e não encontrou alteração nos níveis de seminogelinas degradadas, corroborando a ideia de que hiperviscosidade não está relacionada com KLK3 e outras enzimas proteolíticas, e nem a carência de liquefação do coágulo seminal. (ESFANDIARI et al., 2014)

Em um estudo de análise de imunorreatividade para KLK3, foi encontrado que 28% das amostras hiperviscosas apresenta anticorpos contra KLK3. Num pensamento contrário aos estudos anteriores, os autores acreditam que amostras hiperviscosas podem ter menor atividade de KLK3 no plasma, que resultaria em viscosidade aumentada. (CUPPETT; SIKKA; NAZ, 2017) O que induz a produção de anticorpos contra KLK3 nessas amostras não é conhecida, mas um estudo reportou que 33% de pacientes com neoplasia benigna de próstata também apresentam anticorpos contra KLK3 no soro. Como não houve detecção desses anticorpos em pacientes com prostatites ou câncer de próstata, sugerem-se que a presença de anticorpos contra KLK3 no paciente está relacionada com neoplasia benigna de próstata. (LOKANT; NAZ, 2015)

Não há estudo com KLKB1 em sêmens hiperviscosos. Quanto as demais KLKs, há um estudo que mensurou as KLKs 1-14 presentes no plasma seminal e encontrou que, além da KLK3, apenas a KLK 11 apresenta concentração similar entre amostras normoviscosas e hiperviscosas. Para as demais KLKs seminais, encontrou concentrações reduzidas nas amostras hiperviscosas. Somado ao fato que proteases reduzem a viscosidade seminal *in vitro*, sugerem que a hiperviscosidade seminal possa ser decorrente da diminuição de enzimas



proteolíticas, resultando na redução da hidrólise de grandes proteínas e complexos proteicos presentes no plasma seminal. (EMAMI et al., 2009)

## **2. OBJETIVO**

### **2.1 Objetivo Geral**

Uma vez que a etiologia da hiperviscosidade seminal e sua influência na fertilidade masculina ainda são pouco entendidas, o objetivo deste estudo é analisar parâmetros seminais de infertilidade, conteúdo de mucoproteínas e atividade de proteases em sêmens hiperviscosos.

### **2.2 Objetivos Específicos**

- Comparar os parâmetros seminais de infertilidade entre sêmens hiperviscosos e normoviscosos.
- Comparar o conteúdo total de mucoproteínas no plasma seminal de amostras hiperviscosas e normoviscosas.
- Comparar o perfil de mucinas no plasma seminal de amostras hiperviscosas e normoviscosas através de SDS-PAGE.
- Comparar a atividade proteolítica de enzimas com atividade caseinolítica e gelatinolítica no plasma seminal de amostras hiperviscosas e normoviscosas.
- Comparar a atividade proteolítica das calicreínas plasmática e teciduais no plasma seminal de amostras hiperviscosas e normoviscosas.

### **3. HIPÓTESES**

Hipótese nula: sêmen hiperviscoso apresenta a mesma concentração de mucoproteínas totais e a mesma atividade de enzimas proteolíticas que sêmen normoviscoso.

Hipótese alternativa: sêmen hiperviscoso apresenta diferentes concentrações de mucoproteínas totais e de atividade de enzimas proteolíticas que sêmen normoviscoso.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Delineamento

Trata-se de um estudo observacional realizado com amostras seminais humanas com viscosidades normal e aumentada.

### 4.2 Aspectos éticos

O projeto está aprovado no Comitê de Ética em Pesquisa do Grupo Hospitalar Conceição (nº 17-065). Os pacientes participantes concordaram em participar do estudo e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), autorizando a utilização do sêmen e do resultado do espermograma para o desenvolvimento da pesquisa (TCLE em anexo).

### 4.3 Coleta e Análise seminal

As amostras de sêmen utilizadas nesta pesquisa são provenientes de pacientes da Unidade de Reprodução Humana do Hospital Fêmeina - Grupo Hospitalar Conceição (GHC), encaminhados para realizar o exame do espermograma.

Critério de inclusão: pacientes encaminhados para realizar investigação da infertilidade em decorrência da infertilidade do casal. Fatores de exclusão: amostras seminais submetidas a coluna de gradiente de densidade para averiguação de capacitação espermática; pacientes encaminhados para realizar outros procedimentos na Unidade de Reprodução Humana do Hospital Fêmeina: criopreservação seminal, Inseminação Intrauterina (IIU) e Fertilização *in vitro* (FIV).

Os ejaculados foram coletados por masturbação após 2 a 7 dias de abstinência sexual e mantidos a 37 °C até o momento da análise seminal. Após a liquefação do sêmen, a análise dos parâmetros seminais foi realizada de acordo com o Manual da OMS. (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010)

Resumidamente, o volume seminal foi mensurado utilizando uma pipeta Pasteur graduada de 5 mL e o pH foi mensurado utilizando-se fitas indicadoras de pH (Merk, USA). A viscosidade seminal foi estimada através do teste de fio seminal, onde a amostra é aspirada por uma pipeta de 5 mL e então pipetada. Foi considerada amostra normal, sêmen que

gotejaram ao sair da pipeta; e hiperviscosa, os que formam um fio seminal superior a 2 cm. Em decorrência da inviabilidade de manipulação das amostras hiperviscosas, essas amostras tiveram sua viscosidade diminuída fisicamente através da passagem do sêmen por uma agulha de diâmetro 18G acoplada a uma seringa. Sêmen hiperviscoso foi aspirado e pipetado gentilmente repetidas vezes pela agulha até que a viscosidade se reduzisse a normalidade.

Para concentração e contagem de neutrófilos, espermatozoides foram analisados ao microscópio, em câmara Makler. Todos os espermatozoides e células redondas presentes no grid da câmara foram contados. Neutrófilos foram identificados no esfregaço em lâmina. Para motilidade, 100 espermatozoides foram contados de forma aleatória ao microscópio, em câmara Makler, e classificados em móveis ou não móveis. Para a vitalidade, espermatozoides foram analisados ao microscópio em lâmina com eosina; 100 espermatozoides foram analisados e classificados em vivos ou mortos. Morfologia foi realizado um esfregaço em lâmina, fixados e corados com o uso do kit DiffQuik (Merk, USA); 100 espermatozoides foram analisados e classificados em normais ou anormais.

Após a realização do espermograma, o esperma foi centrifugado a 1200 g, por 20 min, em temperatura ambiente, para separar plasma seminal de espermatozoides. O plasma seminal foi criopreservado sem crio-protetor a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Espermatozoides foram descartados seguindo as regras de descarte de material biológico do tipo A3. Antes das análises, o plasma seminal foi descongelado e centrifugado a 16000 g, por 30 min, a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ , para remoção de debris celulares.

#### **4.4 Classificação dos Grupos**

Com base no teste de fio realizado durante o espermograma, as amostras seminais foram classificadas em dois grupos: sêmen de viscosidade normal (grupo controle) e sêmen hiperviscoso (grupo de estudo).

Para contornar vieses decorrentes da infertilidade, as amostras de cada grupo foram subdivididas em férteis e inférteis de acordo com a classificação estabelecida pelo Manual da OMS. (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010) Resultando em quatro grupos de estudo: Normoviscosos férteis; Hiperviscosos férteis; Normoviscosos inférteis; Hiperviscosos inférteis.

#### **4.5 Quantificação proteica e formação dos *pools***

### Base Metodológica

A quantidade total de proteínas foi realizada seguindo o método colorimétrico do ácido bicinconínico (BCA). Nessa metodologia, a amostra é incubada com solução BCA, que é constituída por ácido bicinconínico, sulfato de cobre ( $\text{CuSO}_4$ , fonte de íons de  $\text{Cu}^{2+}$ ), sódio-tartrate (estabilizante, que impede que o sulfato de cobre precipite) e bases que mantem o pH alcalino em 11.25. Em meio alcalino, íons de cobre  $\text{Cu}^{2+}$  interagem com o nitrogênio presente nas ligações peptídicas e são reduzidos de  $\text{Cu}^{2+}$  a  $\text{Cu}^{1+}$  (Reação de Biureto). Por sua vez, os íons de  $\text{Cu}^{1+}$  reagem com moléculas de ácido bicinconínico (1:2) formando um complexo colorimétrico estável. A intensidade colorimétrica do complexo é proporcional a concentração proteica na amostra e tem absorção máxima a 562 nm. A concentração proteica é determinada plotando-se os resultados da intensidade colorimétrica da amostra em uma curva com diferentes concentrações conhecidas de albumina bovina. (SMITH et al., 1985)

O tempo de incubação da reação não é crítico e pode ser desenvolvido num intervalo de 2 h a *overnight*, em temperatura ambiente. A 37 °C, o tempo de incubação pode ser reduzido para 30 min. O que pode interferir na reação é a presença de íons  $\text{Cu}^{1+}$  existentes na água, quando as amostras são diluídas previamente a análise. Para solucionar esse problema, a água utilizada deve ser deionizada, que é um processo de remoção de íons utilizando-se colunas de troca iônica. (SMITH et al., 1985)

### Metodologia

O kit ácido bicinconínico (catálogo BCA1-1KT) foi obtido da Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). A concentração de proteínas totais no plasma seminal foi dosada utilizando o método colorimétrico do ácido bicinconínico (BCA) adaptado de Smith et al 1985 (SMITH et al., 1985). Cada amostra foi diluída 1:80 em água deionizada e 20  $\mu\text{L}$  de amostra diluída foi incubada com 200  $\mu\text{L}$  de solução BCA, por 30 min, a 37 °C, em microplaca de 96 poços. Após a incubação, a absorbância foi mensurada a 540 nm em espectrofotômetro SpectraMax (Molecular Devices, Sunnyvale, USA) e a concentração foi determinada através de uma curva com diferentes concentrações conhecidas de albumina bovina criada em triplicata (0-1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Ensaio realizado em triplicata.

Esse trabalho faz parte de uma pesquisa maior de proteômica em sêmen, em que as análises estão sendo realizadas em *pools*. Assim, após a quantificação proteica, foi preparado um *pool* para cada grupo. Para cada amostra, foi utilizado um volume que correspondesse a 500  $\mu\text{g}$  de proteína; dessa maneira, cada amostra contribuiu com a mesma quantidade de

proteínas totais para o *pool*. Os *pools* foram quantificados em triplicada usando o mesmo método de BCA e foram utilizados para as análises.

#### 4.6 Quantificação de Mucoproteínas Totais

##### Base Metodológica

Mucoproteínas (ou glicoproteínas ácidas) são proteínas glicosiladas que se diferenciam das demais glicoproteínas devido ao grau de glicosilação e características de solubilidade. Mucoproteínas apresentam um maior conteúdo de carboidratos, que podem representar até 80% do peso molecular; enquanto que glicoproteínas em geral apresentam um conteúdo de carboidratos inferior a 4% do peso molecular. Assim, 4% de peso molecular constituído por carboidratos é rotineiramente utilizado como um limiar de diferenciação entre mucoproteínas e as demais glicoproteínas. Outra característica que as diferenciam é que mucoproteínas são solúveis a vários reagentes químicos, condições de pH e temperatura, que causam desnaturação e precipitação de glicoproteínas e proteínas não glicosiladas. Por exemplo, soluções rotineiras utilizadas para precipitação proteica e glicoproteica, como etanol, ácido perclórico e ácido tricloroacético, e a incubação em temperaturas elevadas (incluindo a fervura) não causam dessolubilização e precipitação das mucoproteínas. (ANDERSON; MACLAGAN, 1954; FOURNIER; MEDJOUBI; PORQUET, 2000; JOHANSSON; SJÖVALL; HANSSON, 2013; LUO et al., 2015; WINZLER, 1955)

Em decorrência dessas diferenças, mucoproteínas totais podem ser isoladas por precipitação seletiva e quantificadas. Inicialmente, precipitam-se proteínas e glicoproteínas da amostra com a adição etanol, ou acidificação do meio com ácido perclórico ou ácido tricloroacético ou incubação em temperaturas próximas a 100 °C. Após, as mucoproteínas em solução podem ser mensuradas diretamente no sobrenadante por diferentes técnicas que avaliam conteúdo proteico ou conteúdo de carboidratos. Para a eliminação de outros tipos moleculares que podem estar presentes no sobrenadante e que podem causar interferência na mensuração (como carboidratos, lipídios e reagentes), as mucoproteínas podem ser precipitadas com ácido fosfotúngstico, lavadas e ressuspendidas em um solvente puro para o desenvolvimento da avaliação do conteúdo mucoproteico. (TECLES; MARTÍNEZ-SUBIELA; CERÓN, 2007; WINZLER, 1955)

Um dos métodos mais utilizados para a quantificação de mucoproteínas é por aferição de tirosinas com o reagente de Folin–Ciocalteu. A tirosina apresenta um grupamento fenólico e o reagente de Folin–Ciocalteu reage com grupamentos fenólicos formando um complexo

colorimétrico azul, cuja intensidade pode ser determinada entre 640-700 nm. A concentração é determinada plotando-se os resultados da intensidade colorimétrica em uma curva com diferentes concentrações conhecidas de tirosina. (ACHARYA; KATYARE, 2004; FOLIN; CIOCALTEAU, 1927)

#### Metodologia

O kit Mucoproteínas (Ref. 20) foi obtido da Labtest Diagnóstica (Lagoa Santa, MG, Brasil). O ensaio de quantificação de mucoproteínas foi adaptado de Winzler et al 1955 e consiste no isolamento das mucoproteínas por precipitação seletiva, seguida da quantificação das mucoproteica através da aferição de tirosinas. (WINZLER, 1955) Em microtubos, 100 µL de amostra contendo 300 µg de proteína são incubados com 400 µL ácido perclórico 0,75 M, por 10 min, em temperatura ambiente. As proteínas não mucoides são sedimentadas por centrifugação a 10.000 rpm, por 10 min. 300 µL do sobrenadante são incubados com 50 µL de ácido fosfotúngstico 0,017 M por 15 min, em temperatura ambiente. Após, as mucoproteínas são sedimentadas por centrifugação a 3.500 rpm, por 5 min e lavadas com ácido fosfotúngstico 0,017 M em água destilada (20 µL:100 µL). Para a mensuração, o pellet é solubilizado em 200 µL de carbonato de sódio 0,38 M e é transferido para um poço de uma microplaca de 96 poços. Branco consiste de 200 µL de carbonato de sódio 0,38 M. Um volume de 10 µL de reagente de Folin é adicionado em cada poço, incluindo o branco, e incubados por 15 min, a 37 °C. A quantidade de mucoproteína é mensurada a 680 nm em espectrofotômetro SpectraMax (Molecular Devices, Sunnyvale, USA) e a concentração é determinada plotando-se os resultados em uma curva com diferentes concentrações conhecidas de tirosina realizadas em triplicata (0-200 µg/mL). Ensaio realizado duas vezes em triplicata.

### **4.7 Eletroforese SDS-PAGE de gradiente**

#### Base Metodológica

A eletroforese constitui num processo de migração de moléculas carregadas eletricamente entre dois eletrodos e é utilizada para fracionar misturas de proteínas utilizando-se um gel de poliacrilamida: Gel de Eletroforese de Poliacrilamida (PAGE). A poliacrilamida é um polímero sintético constituído por monômeros de acrilamida que se ligam entre si na presença de um catalizador, como o TEMED (tetra-methyl-ethylenediamine). A matriz



polimérica apresenta poros, que são ajustados conforme sua concentração e que limitam a movimentação proteica de forma inversamente proporcional ao tamanho molecular. (BANGA, 1998; SOBIESZEK, 1994)

A separação proteica se torna ótima quando a concentração de acrilamida gera poros adequados para a migração diferenciada das moléculas presentes na amostra. Assim, numa amostra biológica, com grande variabilidade das moléculas presentes, um gel que apresenta um gradiente de concentrações de acrilamida (aumento progressivo na concentração de poliacrilamida no gel, resultando em diminuição progressiva no tamanho dos poros) permite uma boa resolução na separação para vários tamanhos de proteínas. (BANGA, 1998; MARGOLIS; KENRICK, 1967; SOBIESZEK, 1994)

O SDS (sódio-dodecil-sulfato) é um agente desnaturante de carga negativa que causa a linearização das proteínas e que se liga às proteínas, de forma proporcional ao tamanho molecular de cada proteína, acrescentando carga negativa a elas. Dessa maneira, o SDS torna as proteínas semelhantes quanto a estrutura (lineares) e quanto ao balanço de cargas, e as proteínas se diferenciam uma das outras apenas com relação ao tamanho molecular: SDS-PAGE. (BANGA, 1998; SOBIESZEK, 1994)

### Metodologia

A eletroforese por SDS-PAGE de gradiente foi adaptada de Margolis 1967. (MARGOLIS; KENRICK, 1967) Resumidamente, um gel de corrida de 6% a 20% de poliacrilamida foi sobreposto por um gel de empacotamento de 4% poliacrilamida. 75 µg de proteína de cada pool foi aplicada no gel com 5µL de Tampão de amostra redutor (4% SDS, 20% glicerol, 0,01% azul de bromofenol, 125 mM Tris-HCL, β-mercaptoetanol, pH 6.8) e submetidas a uma diferença de potencial de 80 V para separação proteica. Após a eletroforese, o gel foi corado através de incubação overnight com solução Coomassie Blue G250 2,5% (Coomassie Blue G250 2,5% [w/v]; metanol 30%, ácido acético 10% [v/v]) em temperatura ambiente e com agitação. Após incubação, o gel foi lavado com água destilada e incubado com solução de descoloramento (metanol 30%, ácido acético 10% [v/v]) até que as bandas aparecerem (60-90 min)

## **4.8 Análise de Atividade Enzimática Proteolítica: atividade caseinolítica**

### Base Metodológica

Azocaseína é substrato para diversas proteases. Essa molécula é formada a partir da conjugação da proteína caseína com o grupamento colorimétrico azo-sulfanilamida, que apresenta coloração amarelo avermelhada e absorção máxima a 440 nm. (CHARNEY; TOMARELLI, 1947; COELHO et al., 2016)

O ensaio se baseia na hidrólise da azocaseína por enzimas presentes na amostra durante um período de incubação, em um ambiente com pH e temperatura adequados para a solubilização do substrato e para a atividade das enzimas presentes na amostra. Moléculas de azocaseína hidrolisadas durante a reação geram como produtos aminoácidos e pequenos peptídeos contendo o grupamento azo-sulfanilamida. Uma vez que a azocaseína íntegra precipita em meio ácido, a adição de ácido tricloro acético (TCA) à reação resulta na precipitação das moléculas de azocaseína que não foram hidrolisadas durante o período de incubação e a consequente finalização da reação. Essas moléculas precipitadas podem ser separadas dos produtos da hidrólise por filtração ou centrifugação, pois os produtos são solúveis em TCA e permanecem no sobrenadante sem precipitar. Os produtos formados são quantificados colorimetricamente a 440 nm no sobrenadante, informando a atividade proteolítica caseinase na amostra, pois a quantidade de produtos é proporcional a atividade enzimática caseinolítica presente na amostra. Os resultados são expressos em Abs 440 nm/tempo de incubação. (CHARNEY; TOMARELLI, 1947; COELHO et al., 2016)

### Metodologia

Azocaseína (catálogo A2765) foi obtido da Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). A atividade proteolítica utilizando azocaseína como substrato foi realizada por ensaio colorimétrico adaptado de Charney et al 1947. (CHARNEY; TOMARELLI, 1947) Em microtubos, diferentes concentrações de proteína (0 - 500 µg) são diluídas em Tampão Tris-HCl 50 mM pH 8.0 até completar um volume de 83 µL de amostra + tampão. Branco constitui de 83 µL de tampão apenas. As reações enzimáticas são iniciadas com a adição de 17 µL de azocaseína 2,5% e incubados a 37 °C, por 30 min. Após a incubação, a reação é finalizada com a adição 50 µL de ácido tricloroacético 30% (TCA) e incubação a 4 °C, por 30 min. A solução é centrifugada a 10.000 rpm por 10 min em temperatura ambiente e 100 µL de cada sobrenadante é transferido para um poço de uma microplaca de 96 poços. Ao sobrenadante, adiciona-se 100 µL de NaOH 1M e a absorbância é mensurada a 440 nm em espectrofotômetro SpectraMax (Molecular Devices, Sunnyvale, USA). A atividade é expressa

em Absorbância a 440 nm após incubação de reação de 30 min. Ensaio realizado duas vezes em triplicata.

#### **4.9 Análise de Atividade Enzimática Proteolítica: atividade gelanotípica**

##### Base Metodológica

Zimografia denota visualização da atividade enzimática. É uma análise de atividade proteolítica que informa: presença de proteases e quantas variedade de proteases há em uma amostra, tamanho molecular das proteases, quantidade dessas enzimas e presença de isoformas. (BROWN et al., 1993; HEUSSEN; DOWDLE, 1980; HIBBS et al., 1985; LEBER; BALKWILL, 1997; VANDOOREN et al., 2013)

O método é baseado na separação das enzimas por tamanho molecular e na detecção das enzimas devido sua habilidade de degradar um substrato específico. A técnica foi desenvolvida pela primeira vez em 1962, onde a amostra era inicialmente separada por eletroforese em um gel de poliacrilamida e, após, as proteínas eram transferidas do gel para uma membrana contendo um substrato. Heussen 1980 introduziu a copolimerização do gel de poliacrilamida com o substrato e a consequente incubação do gel com um detergente não iônico para renaturar as proteínas; Hibbs 1985 acrescentou cofatores na incubação do gel, acrescentando a detecção de metaloproteases no resultado da técnica. (HEUSSEN; DOWDLE, 1980; HIBBS et al., 1985; VANDOOREN et al., 2013) Dessa maneira, no método atual, as proteínas são inicialmente separadas por tamanho molecular em um gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE), sem uso de agente redutor, para que as pontes de dissulfeto não sejam rompidas. Após a eletroforese, o gel é incubado com detergente e cofatores iônicos. O detergente Triton X-100 remove o SDS presente no gel e permite que as proteínas renaturem-se parcialmente; e os cofatores permitem que metaloproteases apresentem atividade enzimática. A renaturação parcial das proteínas permite que algumas proteases retomem a sua atividade proteolítica e degradem o substrato presente no local em que elas se encontram no gel. O gel é corado com Coomassie Blue, tornando-se azul (em decorrência da coloração do substrato proteico presente em todo o gel) com a presença de zonas claras, que são as zonas proteolíticas. As zonas proteolíticas são regiões não pigmentadas que contam com presença de proteases que degradaram o substrato, gerando a visualização da atividade enzimática. (BROWN et al., 1993; HEUSSEN; DOWDLE, 1980; HIBBS et al., 1985; LEBER; BALKWILL, 1997; VANDOOREN et al., 2013) Em amostras clínicas, é comum a presença de bandas claras com distorções. Isso é provavelmente

decorrente da presença de outras proteínas na mesma banda que a protease, resultando na distribuição não homogênea da protease dentro da banda. (BROWN et al., 1993)

A técnica é altamente sensível e permite detectar quantidades de proteases tão baixas quanto 32 pg de enzima. A atividade proteolítica pode ser quantificada, pois há uma relação entre área de atividade detectada na zimografia e a quantidade de enzima na amostra. A relação é linear em quantidades inferiores a 1 ng de enzima por zona proteolítica e uma parábola em quantidades superiores a 1 ng de enzima por banda. (BROWN et al., 1993; LEBER; BALKWILL, 1997; VANDOOREN et al., 2013)

A variedade de enzimas proteolíticas detectadas depende do substrato utilizado. Para cada tipo de substrato, diferentes enzimas da amostra terão capacidade de degradar o substrato utilizado. Os substratos mais utilizados são: gelatina, caseína e colágeno; e esses substratos têm sido extensamente empregados para detecção e estudo de metaloproteases de matriz extracelular (MMPs). (BROWN et al., 1993; LEBER; BALKWILL, 1997; VANDOOREN et al., 2013) Plasminogênio pode ser empregado para detecção e estudo de enzimas ativadoras de plasminogênio. (HEUSSEN; DOWDLE, 1980)

A zimografia não detecta apenas enzimas ativas *in vivo*; mas também enzimas que se encontram inativadas ou inibidas *in vivo*. Zimogênios apresentam um domínio inibitório que recobre o sítio catalítico ou que causa uma conformação enzimática que inibe o sítio catalítico; desse modo, essas enzimas estão inativas *in vivo*. Durante a zimografia, essas proteínas são inicialmente desnaturadas com o SDS-PAGE e, após, são renaturadas com o detergente Triton X-100. Entretanto, a renaturação é parcial, suficiente para que o sítio catalítico apresente atividade, mas insuficiente para que a região inibitória do zimogênio retorne a sua posição e conformação originais para que iniba o sítio catalítico da enzima. Dessa forma, as pró-enzimas apresentam atividade na técnica da zimografia e zimogênios são detectados como uma banda de alguns kDa maior que a enzima ativa. Semelhantemente, enzimas complexadas de forma não covalentes com moléculas inibitórias, são dissociadas pelo agente redutor SDS e separadas da enzima durante a eletroforese. Na renaturação parcial, as interações das enzimas com as moléculas inibitórias não são refeitas e essas enzimas também apresentaram atividade na zimografia. Por conseguinte, a zimografia detecta, caracteriza e quantifica proteases que estão ativas, inativas e inibidas presentes em uma amostra *in vivo*. (BROWN et al., 1993; VANDOOREN et al., 2013)

## Metodologia

A análise de atividade enzimática proteolítica utilizando gelatina como substrato foi realizada por zimografia adaptado de Heussen et al 1980 e Hibbs et al 1985. (HEUSSEN; DOWDLE, 1980; HIBBS et al., 1985) Resumidamente, um gel de corrida 8% poliacrilamida e 1% de gelatina foi sobreposto por um gel de empacotamento de 4% poliacrilamida. 90 µg de proteína de cada amostra foi aplicada no gel com 5 µL de Tampão de amostra não redutor (4% SDS, 20% glicerol, 0,01% azul de bromofenol, 125 mM Tris-HCL, pH 6.8) e submetidas a uma diferença de potencial de 80 V para separação proteica. Após a eletroforese, o gel foi incubado com Tampão Triton X-100 2,5% (Triton 2,5%, CaCl<sub>2</sub> 5 mM, ZnCl<sub>2</sub> 1 mM, Tris-HCl 50 mM, pH 7.5) 2x por 30 min, seguida por uma lavagem (10 min) e uma incubação overnight com Tampão Triton X-100 1,0% (Triton 1,0%, CaCl<sub>2</sub> 5 mM, ZnCl<sub>2</sub> 1 mM, Tris-HCl 50 mM, pH 7.5). Todas as incubações ocorreram sob agitação, em temperatura ambiente.

O gel foi corado através de incubação overnight com solução Coomassie Blue G250 2,5% (Coomassie Blue G250 2,5% [w/v]; metanol 30%, ácido acético 10% [v/v]) em temperatura ambiente e com agitação. Após incubação, o gel foi lavado com água destilada e incubado com solução de descoramento (metanol 30%, ácido acético 10% [v/v]) até que as bandas aparecerem (60-90 min).

#### **4.10 Análise da Atividade Enzimática de Calicreínas**

##### Base Metodológica

Calicreínas são serino proteases quimotripsina-like/tripsina-like. KLKs plasmática e quase todas as teciduais apresentam resíduo negativo de asparagina no sítio ativo, assim, têm afinidade para clivar em resíduos com cadeias laterais com carga positivas, como arginina e lisina, de forma semelhante a tripsina. Entretanto, KLK3 apresenta resíduos hidrofóbicos no sítio ativo e cliva com afinidade resíduos hidrofóbicos, como tirosina, triptofano e fenilalanina, uma atividade semelhante a quimotripsina. (KALINSKA et al., 2016)

A análise de atividade de calicreínas se baseia no uso de substratos sintéticos específicos para KLKs. O substrato S-2302 é específico para KLKB1 e o substrato S-2266 é específico para KLKs teciduais tripsina-like. Uma vez que KLK3 apresenta atividade quimotripsina-like, ele não age sobre o substrato S-2266. O substrato, ao ser clivado, libera o produto cromogênico *p*-nitroanilina (pNA). A diferença de absorvância entre o substrato original e o produto formado é monitorado a 405 nm, A intensidade, decorrente do acúmulo do produto, aumenta com tempo de forma proporcional a atividade enzimática. (CLAESON et al., 1978)

Tabela 2. Substratos S-2302 e S-2266 utilizados nas análises de calicreínas.

<b>Substrato</b>	<b>Sequência, fórmula, sítio de clivagem</b>
S-2302	H-D-Prolina-L-Fenilalanina-L-Arginina-p-Nitroanilina Dihidrocloreto H-D-Pro-Phe-Arg-pNA·2HCl Prolina-Fenilalanina-Arginina-
S-2266	H-D-Valina-L-Leucina-L-Arginina-p-Nitroanilina Dihidrocloreto Val-Leu-Arg-pNA·2HCl Valina-Leucina-Arginina-

### Metodologia

Para essa análise, substratos sintéticos de calicreína plasmática S-2302 (H-D-Prolyl-L-phenylalanyl-L-arginine-p-nitroaniline dihydrochloride) e calicreínas teciduais S-2266 (H-D-Valyl-L-leucyl-L-arginine-p-Nitroaniline dihydrochloride) foram obtidas da Chromogenix (Milão, Itália).

O ensaio foi adaptado de Claeson et al 1978. (CLAESON et al., 1978) Em cada poço da placa de 96 poços, 100 µg de proteína seminal é incubado em um volume final de 90 µL com Tampão Tris-HCl 20 mM pH 7.5, a 37 °C, por 30 min, para estabilização da temperatura. Após a incubação, as reações são iniciadas com a adição de 10 µL de substrato S-2302 ou substrato S-2266 (0,2 mM) em cada poço. A quantidade de produto *p*-nitroanilina é mensurada a 405 nm por 30 min, a cada 14 seg, em espectrofotômetro SpectraMax (Molecular Devices, Sunnyvale, USA). Ensaio realizado duas vezes em triplicata.

### **4.11 Análise Estatística**

Dados foram analisados utilizando analysis of variance (ANOVA) para distribuição normal e Kruskal-Wallis para distribuição não normal. Comparação entre dois grupos foi realizada utilizando teste T de Student para distribuição normal e teste Mann-Whitney para distribuição não normal. Foi considerado significativo  $p < 0,05$ . Análises estatísticas foram realizadas usando SPSS 18 ou GraphPad Prism 5.

## **5. RESULTADOS**

Os resultados desse estudo serão apresentados na forma de um artigo submetido a revista “Andrology”.

## **TISSUE AND PLASMATIC KALLIKREINS DEMONSTRATE ALTERED ACTIVITY IN HYPERVISCIOUS AND INFERTILE SEMINAL PLASMA**

C. T. Rodrigues<sup>1,3</sup>, L. Baptista<sup>2</sup>, P. Zanon<sup>3</sup>, Brum, I.S<sup>1</sup>, Berger. M<sup>3</sup>, Capp. E<sup>1,3</sup>.

<sup>1</sup>Institute of Health Science/Department of Physiology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 90050-170, Porto Alegre, Brazil

<sup>2</sup>Unit of Human Reproduction/Femina Hospital, Grupo Hospitalar Conceição, 90430-000, Porto Alegre, Brazil

<sup>3</sup>Experimental Research Center, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, 90035-903, Porto Alegre, Brazil

### **SUMMARY**

Hyperviscous semen is a physical alteration wherein seminal plasma adheres strongly to itself after coagulum degradation. It occurs in 11%–32% of ejaculates; however, its etiology and its impact on male fertility are not well understood. The aim of this study is to evaluate mucoproteins content and to measure protease activity in seminal plasma of normoviscous and hyperviscous samples from fertile and infertile patients. We found association of hyperviscosity with seminal characteristics of infertility, showing reduced volume, sperm concentration, motility and vitality. In addition, hyperviscous semen have significant increase of neutrophils concentration. The mucoprotein content is reduced in hyperviscous and in infertile samples, indicating deficiency in seminal plasma components in these ejaculates. These results suggest that hyperviscous semen have low quality when comparing with normoviscous semen. Caseinolytic analyses showed increased activity in fertile hyperviscous semen. A similar result was found in the gelatinolytic analyses, in which metalloproteases showed increased activity in hyperviscous and in infertile groups. In a more specific analysis with kallikreins, the results revealed an increased activity of tissue kallikreins in hyperviscous semen, and increased activity of plasmatic kallikrein in hyperviscous and in infertile samples. The increased protease activity suggests that hyperviscosity is not due to the lack of seminal coagulum liquefaction. Considering an increase of proteolytic enzymes is associated with inflammatory process and the proteases are secreted from the prostate, we suggest that an inflammatory process in the prostate gland is happening in the patients with hyperviscous semen.



**Key words:** Seminal hyperviscosity, infertile men, tissue kallikrein, plasmatic kallikrein

## INTRODUCTION

In the fresh human ejaculate, vesicular proteins form a coagulum that entraps the sperm cells. Up to 60 minutes, proteolytic prostatic enzymes cleave the seminal clot, turning the semen to a liquefied fluid with low viscosity and releasing the sperm cells. (ESFANDIARI et al., 2014; YOSHIDA et al., 2008) However, in some men, the liquefied semen shows a semi gelatinous aspect called hyperviscosity, which differs from non-liquefied semen because its stickiness does not change with time. (EMAMI et al., 2009; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010)

Hyperviscosity is detected during diagnose of male infertility and assisted reproduction techniques by gently pipetting the semen with a Pasteur pipette. Normal sample leaves the pipette in small discrete drops, whereas hyperviscous semen form a thread longer than 2 cm. (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010) The hyperviscous semen is treated physically or chemically; because it impairs manipulation for diagnosis or its use for intra-uterine insemination (IUI) and *in vitro* fertilization (IVF), and it decreases cryopreservation success. (ESFANDIARI et al., 2008; KERSHAW-YOUNG; MAXWELL, 2012)

Hyperviscosity is one of the most common macroscopic alteration in semen, and its prevalence has been recorded between 11-32%. (ANDRADE-ROCHA, 2005); (ELIA et al., 2009; GONZALES; KORTEBANI; MAZZOLLI, 1993; GOPALKRISHNAN; PADWAL; BALAIAH, 2000) However, the biophysical alteration and physiological etiology of this increased viscosity is not completely identified.

Hyperviscous semen is associated with reduced sperm motility that probably impair normal sperm progression through the female genital tract. It is most likely that low motility is not only resulted by the trapping effect of the increased viscosity, but also due to alterations on the seminal plasma composition. Andrade-Rocha showed that fructose and zinc are at low concentration in hyperviscous semen. Fructose is the main source of energy for the sperm, and zinc regulates sperm motility and enzymes activities in semen. (ANDRADE-ROCHA, 2005; YOSHIDA et al., 2008) In addition, hyperviscous semen have an impairment of both enzymatic and non-enzymatic antioxidative molecules, resulting in lipid peroxidation and protein oxidation. Both damages on sperm reduces membrane function, consequently, sperm

motility and fertilization capacity. (AYDEMIR et al., 2008; LAYALI et al., 2015; SICILIANO et al., 2001) Furthermore, two studies have reported that the use of hyperviscous semen in assisted reproduction therapies results in poor success outcome in both IUI and IVF procedures. (ESFANDIARI et al., 2008; ESFANDIARI; GOTLIEB; CASPER, 2006)

Mucoproteins are high glycosylated proteins that have a higher content of carbohydrates than the most glycoproteins (up to 80% of the molecular weight). In addition, they are soluble in many acidic solutions that precipitate low carbohydrate's content glycoproteins and non-glycoside proteins. (BOLTIN et al., 2013; JOHANSSON; SJÖVALL; HANSSON, 2013; TECLES; MARTÍNEZ-SUBIELA; CERÓN, 2007) One mucoprotein family is the mucin family, which is present in many exocrine secretions and it is involved in physical, chemical and immunity functions. Some mucoproteins have gel-forming properties that are responsible for increasing viscosity in a variety of body secretions. (JOHANSSON; SJÖVALL; HANSSON, 2013) So far, there is few knowledge about these components and their abundance in semen.

Proteases regulates physiological processes by determining protein folding and function. They are aberrantly expressed or under-regulated during many pathological conditions. (MADALA et al., 2010) The matrix metalloproteinase (MMP) family are zinc dependent proteolytic enzymes capable of degrading extracellular matrix components. Some substrates they cleave include collagens, fibronectin, laminin, aggrecans, and elastin. *In vitro*, some of them also have the ability to degrade gelatin. They participate in multiple physiological process in the body as well as pathological process such as platelet aggregation, inflammation and neoplasia. (HADLER-OLSEN; WINBERG; UHLIN-HANSEN, 2013)

Kallikreins (KLKs) are chymotrypsin/trypsin-like serine protease constituted by two families: plasmatic and tissue KLKs. The one member Plasmatic KLK (KLKB1) family release kinins from kininogens, which has a main role in inflammatory process in the body. The tissue KLKs comprises 15 enzymes named KLK 1-15. They participate in diverse physiological roles including kinins formation from kininogens cleavage, and extracellular matrix degradation. The KLKs are the most abundant enzymes in semen and are most known because of their action in clot lyses. (KALINSKA et al., 2016) Nevertheless, there is no measurements of the activity of these enzymes in hyperviscous semen.

Thereby mucoproteins and proteases are potential targets for understanding semen hyperviscosity. The aim of this study is to investigate 1) total mucoproteins content; 2) gel-forming mucin content through 1D protein profile; 3) protease activity against casein and gelatin 4) KLKs activity in seminal plasma of fertile and infertile normoviscous and hyperviscous semen.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Ethical approval**

This is an observational study with men undergoing semen analysis for infertility investigation at the Human Reproduction Unit of the Conceição Hospital Group (GHC). The Research Ethics Committee board of the GHC approved this study (approval no. 17-065). All included patients provided informed written consent prior participation.

### **Semen Samples Analysis**

Semen samples were obtained by masturbation into a sterile plastic container after 2 - 7 days of ejaculatory abstinence. After liquefaction, samples were examined according to the World Health Organization 2010 Manual for analyses of the seminal parameters. Seminal viscosity was determined during the spermogram by pipetting the semen and analyzing the thread formation. Ejaculates with a thread formation above 2 cm were considered hyperviscous semen. After the semen examination, seminal plasma was separated from cell through centrifugation at 1200 g for 20 minutes and was directly frozen at -80 °C until the analysis. Before the first analyses, seminal plasma was thawed and centrifuged at 16,000 g for 1 hour at 4 °C to remove any cellular debris.

### **Study Design**

Samples were divided into two groups depending on viscosity: normoviscosity and hyperviscosity. In each group, samples with all the seminal parameters above the cut off values determined by World Health Organization 2010 Manual were classified as fertile (sperm concentration >  $15 \times 10^6$ /mL, total sperm number >  $39 \times 10^6$ , ejaculate volume > 1.5 mL, motility > 32%, morphology > 4%, and vitality > 58%). Those samples with one or more parameters below these cut offs were classified as infertile samples. Therefore, the samples were divided in four final groups.

In addition, only samples that had similar seminal parameters were used for pooling and the analyses. Samples from Fertile Normoviscous group were matched up with samples

from Fertile Hyperviscous group, and samples from Infertile Normoviscous group were matched up with samples from Infertile Hyperviscous group. Non-fitted samples and azospermic samples were excluded. This was established to try to isolate the study parameter (viscosity), and avoid bias from other parameters in the results, because some studies have already shown a difference in the seminal plasma protein diversity and concentration according to seminal parameters variations. (HERWIG et al., 2013)

### **Total protein concentration and *pools***

Total protein concentration in the seminal plasma was evaluated using the bicinchoninic acid (BCA) protein assay according to Smith et al 1985. BCA kit (catalogue BCA1-1KT) was obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). Quantification was performed incubating 20  $\mu$ L of sample with 200  $\mu$ L of BCA solution for 30 min at 37 °C in a 96-well microplate. After incubation, the absorbance was read at 540 nm using a SpectraMax spectrophotometer (Molecular Devices, Sunnyvale, USA). Total protein concentration was calculated using a quantification standard curve of different concentrations of bovine serum albumin (0–1000  $\mu$ g/mL) generated in triplicate. Only matched up samples were quantified. Each sample was quantified in triplicate.

After protein quantification, samples of the same group were pooled, taking care that each sample contribute with the same amount of total protein to the final pools (500  $\mu$ g). These pools were quantified in triplicate using the same bicinchoninic acid protein assay, and they were used for all the following analyses.

### **Total Mucoprotein Quantification**

Total mucoprotein concentration was adapted from Winzler et al 1955, using a Mucoproteins kit (catalogue 20) obtained from Labtest Diagnóstica (Lagoa Santa, MG, Brazil). (WINZLER, 1955) In microtubes, 100  $\mu$ L of sample containing 300  $\mu$ g of protein was treated with 400  $\mu$ L of 0.75 M perchloric acid for 10 min in ambient temperature for non-mucoid protein precipitation. After centrifugation for 10000 rpm for 10 min, 300  $\mu$ L of supernatant was treated with 50  $\mu$ L of 0,017 M phosphotungstic acid for 15 min in ambient temperature for mucoid protein precipitation. After centrifugation for 3500 rpm for 5 min, mucoprotein precipitate was washed once with 20  $\mu$ L of 0.017 M phosphotungstic acid in 100

$\mu\text{L}$  of distilled water, thoroughly drained, and dissolved in 200  $\mu\text{L}$  of 0.38 M sodium carbonate. The solution was transferred to 96-well microplate and incubated with 10  $\mu\text{L}$  of Folin-Ciocalteu reagent for 15 min at 37 °C. After incubation, the absorbance was read at 680 nm using a SpectraMax spectrophotometer (Molecular Devices, Sunnyvale, USA). Total mucoprotein concentration was calculated using a quantification standard curve of different concentrations of tyrosine (0–200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) generated in triplicate. Results represent the mean values of two experiment performed in triplicate.

### **Gradient SDS-PAGE electrophoresis**

Gradient SDS-PAGE was developed as described by Margolis 1967 with some modification. (MARGOLIS; KENRICK, 1967) Briefly, a 6%-20% polyacrylamide gel was overlaid with a 4% polyacrylamide stacking gel. 75  $\mu\text{g}$  of protein from each pool sample was loaded with a reducing sample buffer (4% SDS, 20% glycerol, 0,01% bromophenol blue, 125 mM Tris-HCL,  $\beta$ -mercaptoethanol, pH 6.8), and run at 80 V for protein separation until the dye reaches the gel base. Coomassie Blue G250 (methanol 30% and acetic acid 10%) and distained in the same solution without Coomassie Blue until the appearance of the bands (60-90 min).

### **Assay for azocaseinolytic activity**

Azocasein (catalogue A2765) was obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). Protease activity was measured according to Charney et al 1947 with some modification. (CHARNEY; TOMARELLI, 1947). Different protein concentration from each sample (0 - 500  $\mu\text{g}$ ) were mixed with Tris-HCl 50 mM pH 8.0 buffer until a final volume of 83  $\mu\text{L}$  in microtubes. Blank had only buffer (83  $\mu\text{L}$ ). Enzymatic reactions were started by addition of 17  $\mu\text{L}$  of azocasein 2.5% and incubated at 37°C for 30 min. After incubation, the reaction was stopped by the addition of 50  $\mu\text{L}$  of trichloroacetic acid 30% (TCA) and incubated at 4°C for 30 min. The reaction mixture was centrifuged at 10.000 rpm for 10 min at room temperature, and 100  $\mu\text{L}$  of each supernatant was transferred to a 96-well microplate. To the supernatant, it was added 100  $\mu\text{L}$  of NaOH 1 M, and its absorbance was read at 440 nm using a SpectraMax spectrophotometer (Molecular Devices, Sunnyvale, USA). Activity was expressed in terms of

Absorbance at 440 nm at the time of 30 min of incubation. Results represent the mean values of two experiment performed in triplicate.

#### **Assay for gelatinolytic activity**

Gelatin zymography was developed as described by Heussen et al 1980 with some modification. (HEUSSEN; DOWDLE, 1980) Briefly, 8% polyacrylamide and 1% gelatin running gel was overlaid with a 4% polyacrylamide stacking gel. 90 µg of protein from each pool sample was loaded with a non-reducing sample buffer (4% SDS, 20% glycerol, 0,01% bromophenol blue, 125 mM Tris-HCL, pH 6.8), and run at 80 V for protein separation until the dye reaches the gel base. After electrophoresis, gel was soaked in Triton X-100 2.5% (Triton 2,5%, CaCl<sub>2</sub> 5 mM, ZnCl<sub>2</sub> 1 mM, Tris-HCl 50 mM, pH 7.5) twice for 30 min, followed a brief wash in Triton X-100 1.0% (Triton 1,0%, CaCl<sub>2</sub> 5 mM, ZnCl<sub>2</sub> 1 mM, Tris-HCl 50 mM, pH 7.5) in which the gel was thereafter incubated overnight. All incubations were on shaker at room temperature. The gel was then stained overnight with shaking at room temperature with 0.5% (w/v) Coomassie Blue G250 (methanol 30% and acetic acid 10%) and destained in the same solution without Coomassie Blue until the appearance of the bands (60 min).

#### **Assay for kallikrein activity**

Synthetic substrates for Human plasma kallikrein S-2302 (H-D-Prolyl-L-phenylalanyl-L-arginine-*p*-nitroaniline dihydrochloride) and Human tissue Kallikrein S-2266 (H-D-Valyl-L-leucyl-L-arginine-*p*-Nitroaniline dihydrochloride) were purchased from Chromogenix (Milan, Italy). Assays were adapted for 96-well microplate as described by Claeson et al 1978. (CLAESON et al., 1978) 100 µg of seminal plasma protein was incubated at 37°C, in a final volume of 90 µl of Tris-HCl 20 mM pH 7.5 buffer for temperature stabilization. After 30 min, enzymatic reactions were started by addition of 10 µL of the chromogenic substrate S2302 or S-2266 (0.2 mM). The amount of *p*-nitroaniline produced by the enzymatic reaction was monitored at 405 nm in intervals of 14 s for 30 min using a SpectraMax spectrophotometer (Molecular Devices, Sunnyvale, USA). Activity is expressed in terms of Absorbance at 405 nm by time of incubation. Results represent the mean values of two experiment performed in triplicate.

## Statistical analysis

Data were analyzed by one-way analysis of variance and a Kruskal-Wallis test for normal and non-normal distribution, respectively. Comparison between two groups was made using Student's t-test and the Mann-Whitney U-test for normal and non-normal distribution, respectively. A value of  $p < 0.05$  was considered. Statistical analyses were carried out using SPSS 18 or GraphPad Prism 5.

## RESULTS

### Seminal Analyses

This study evaluated 59 seminal samples from men who attended the Human Reproduction Unit of GHC for infertility investigation between May and November of 2017. The prevalence of the hiperviscosity in the population evaluated was 33.89% (20 samples). Hyperviscosity did not change over time. Aliquots of hyperviscous semen incubated up to 7 hours did not change their viscosity, neither at ambient temperature, nor at 37 °C. Semen samples with high viscosity showed significantly lower semen volume, sperm concentration, total sperm in the ejaculate, sperm motility, and sperm vitality. In addition, it showed a significantly higher concentration of neutrophils. These results are summarized in Table 1. There were no differences in respect to men's age, semen pH, and sperm morphology between the groups (Data not shown). When separating the groups in Fertile and Infertile, there was a higher prevalence of infertile men in the Hyperviscous group (65%) than in the Normoviscous group (20.5%). Table 2.

**Table 1. Seminal parameters in normoviscous and hyperviscous semen**

Parameter	Normoviscous	Hiperviscous	P Value
<b>N. of samples</b>	39 (66.11%)	20 (33.89%)	
<b>Semen volume (mL)</b>	2.74 ± 1.24	2.05 ± 1.18	0.035
<b>Sperm concentration (10<sup>6</sup>/mL)</b>	99.98 ± 83.34	64.74 ± 97.61	0.016
<b>Total Esperm (10<sup>6</sup>)</b>	265.94 ± 285.14	115.91 ± 150.97	0.007
<b>Sperm motility (%)</b>	65.44 ± 18.72	47.53 ± 23.31	0.004
<b>Sperm vitality (%)</b>	78.83 ± 11.47	69.83 ± 18.61	0.010
<b>Neutrophils (10<sup>6</sup>/mL)</b>	0.06 ± 0.16	0.71 ± 1.76	0.013

Values are expressed as mean ± SD.  $P < 0.05$

**Table 2. Prevalence of fertility in the normoviscous and hyperviscous semen groups**

	Normoviscous	Hyperviscous
<b>Fertile</b>	77% (30)	30% (6)
<b>Infertile</b>	20.5% (8)	65% (13)
<b>Azospermic (Infertile)</b>	2.5% (1)	5% (1)
<b>Total</b>	100% (39)	100% (20)

Note: Values are in percentage (number of samples).

### Study samples and Protein concentration

From 59 initial samples, 36 samples were included for the following analyses because of the seminal parameters matched up between the groups, and showed no significant difference between normoviscous and hyperviscous fertile groups, and between normoviscous and hyperviscous infertile groups. This way, the only difference between these groups is the viscosity. In addition, there was no difference in the total protein concentration in the samples among the groups. Table 3.

**Table 3. Seminal parameters in the four groups of study**

	Fertile Normoviscous	Fertile Hyperviscous	Infertile Normoviscous	Infertile Hyperviscous
<b>N. of samples</b>	11	6	7	12
<b>Semen volume (mL)</b>	2.71 ± 0.82	2.96 ± 1.36	2.10 ± 1.22	1.64 ± 0.81
<b>Sperm concentration (10<sup>6</sup>/mL)</b>	117.00 ± 61.97	109.16 ± 72.33	73.48 ± 90.44	47.21 ± 112.18
<b>Total Esperm (10<sup>6</sup>)</b>	291.78 ± 111.78	255.11 ± 104.56	101.01 ± 97.72	58.01 ± 134.99
<b>Sperm motility (%)</b>	69.90 ± 12.16	64.16 ± 11.92	47.57 ± 27.21	35.21 ± 21.74
<b>Sperm vitality (%)</b>	84.27 ± 7.76	80.91 ± 6.96	68.60 ± 17.18	59.51 ± 19.66
<b>Neutrophils (10<sup>6</sup>/mL)</b>	0.06 ± 0.16	0.13 ± 0.14	0.02 ± 0.04	0.32 ± 0.52
<b>Protein Concentration (mg/mL)</b>	67.30 ± 13.90	51.67 ± 10.05	63.16 ± 17.70	63.65 ± 30.71
<b>Pool Protein Concent. (mg/mL)</b>	34.686	32.195	40.107	36.259

Values are expressed as mean ± SD. P<0.05

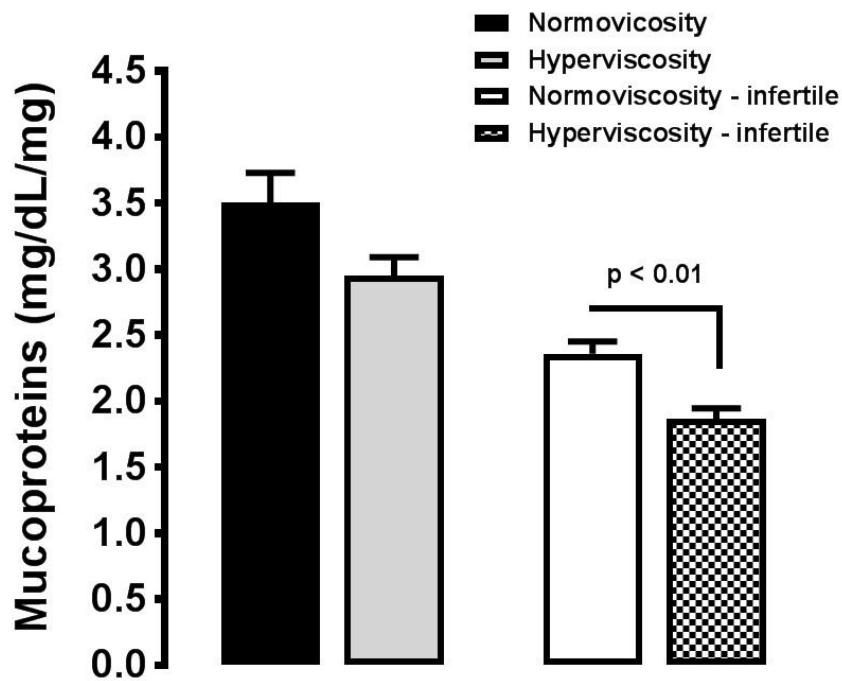
### Mucoprotein

Mucoproteins were analyzed through total mucoprotein content and gradient SDS-PAGE gel. The quantification of the total mucoprotein content revealed that hyperviscous semen has no increased content of mucoprotein. In contrast, it tends to be lower in the fertile hyperviscous group, and it is significantly lower in the infertile hyperviscous group (Figure 1). In addition, there was a significant reduce in the total mucoprotein content when

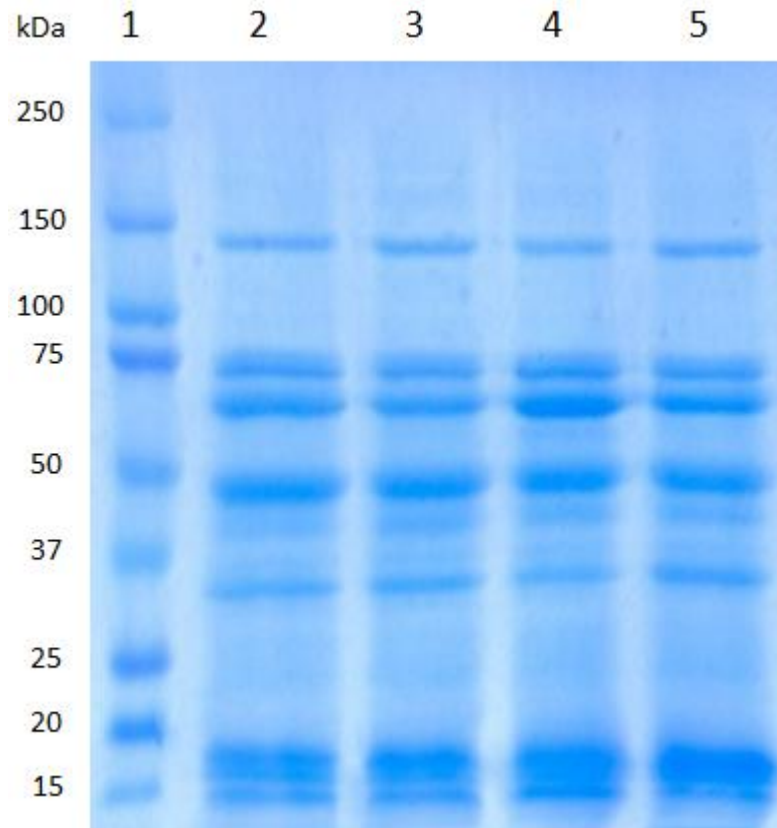


comparing fertile and infertile samples (fertile normoviscous x infertile normoviscous,  $p < 0.01$ ; fertile hyperviscous x infertile hyperviscous,  $p < 0.01$ )

Concerning to the mucins, the gradient electrophoretic analysis showed a similar protein pattern in hyperviscous and normoviscous samples. There were no apparent difference in the pattern around the molecular weights corresponding to the gel-forming mucins ( $> 200$  kDa). The well-visualized bands are 150 kDa, 78 kDa, 70 kDa, 50 kDa, 43 kDa, 30 kDa, 18 kDa, and 15 kDa.



**Fig. 1.** Total mucoprotein content in human seminal plasma. Proteins (300  $\mu$ g) from four seminal plasma groups had mucoproteins precipitated by selectively precipitation and its content measured.

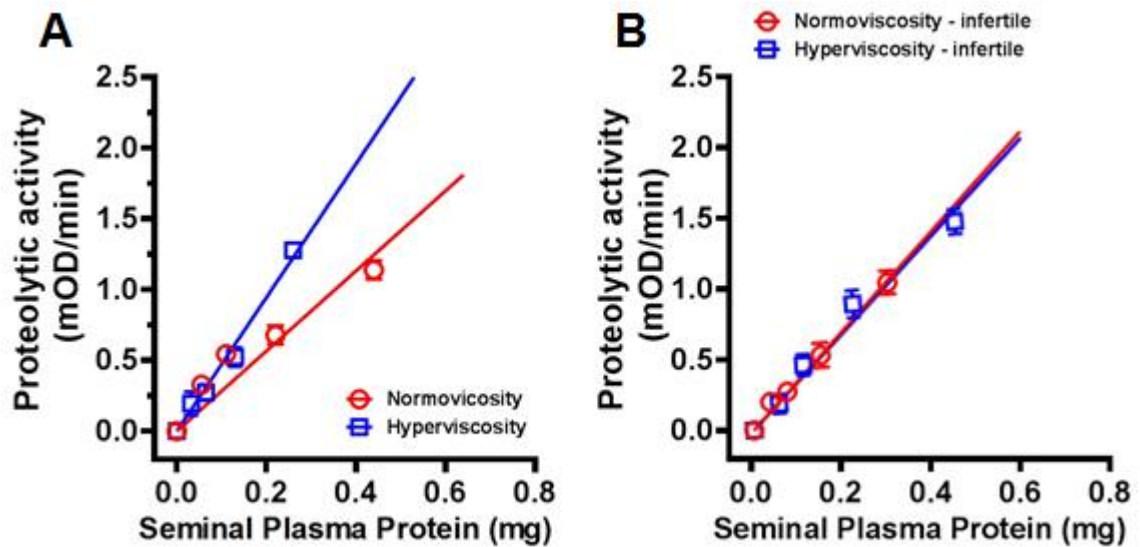


**Fig. 2.** One dimensional gel electrophoresis of human seminal plasma. Proteins (75  $\mu$ g) from four seminal plasma pools were electrophoresed in 6-20% SDS-PAGE gel. Lane 1: molecular weight standards. Lane 2: Fertile Normoviscous group; Lane 3: Fertile Hyperviscous group; Lane 4: Infertile Normoviscous group; Lane 5: Infertile Hyperviscous group.

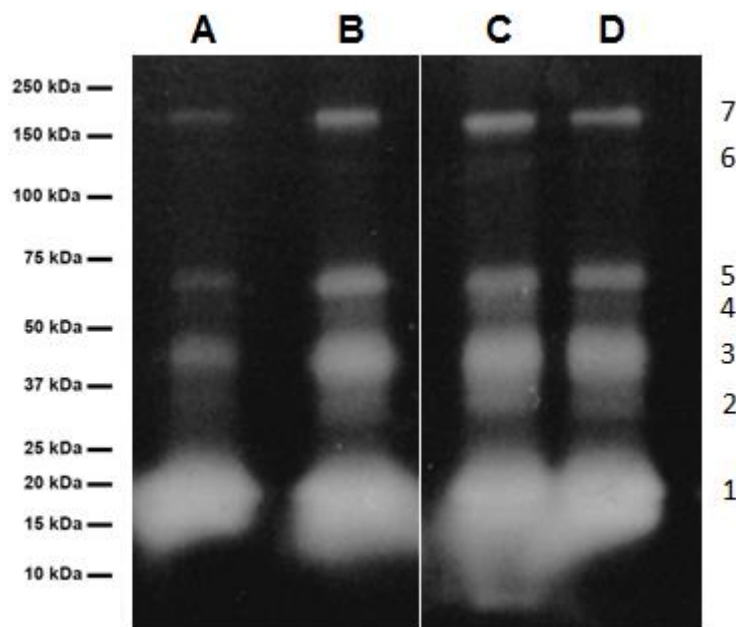
### Caseinolytic and Gelatinolytic activities

General protease activities were analyzed using azocasein and gelatin substrates. The colorimetric analyses of caseinolytic activity showed an increase activity in fertile hyperviscous semen when comparing with fertile normoviscous semen. There was no difference in the infertile groups (Fig. 3). Gelatin zymography of human seminal plasma revealed seven main proteases labelled sequentially by numbers from the lowest molecular weight to the highest (Fig.4). The seven proteases were present in the four groups. The major protease activity was the number 1 and its intensity does not change among the four groups. The weakest band was the number 6 and its intensity did not change among the four groups either. However, all the other proteases varied in intensity when comparing the fertile normoviscous group with fertile hyperviscous group, being stronger at the hyperviscous groups. Between the infertile group there were no difference in intensity of these bands, but

the intensity of the bands were also stronger in these groups when comparing with the fertile normoviscous group.



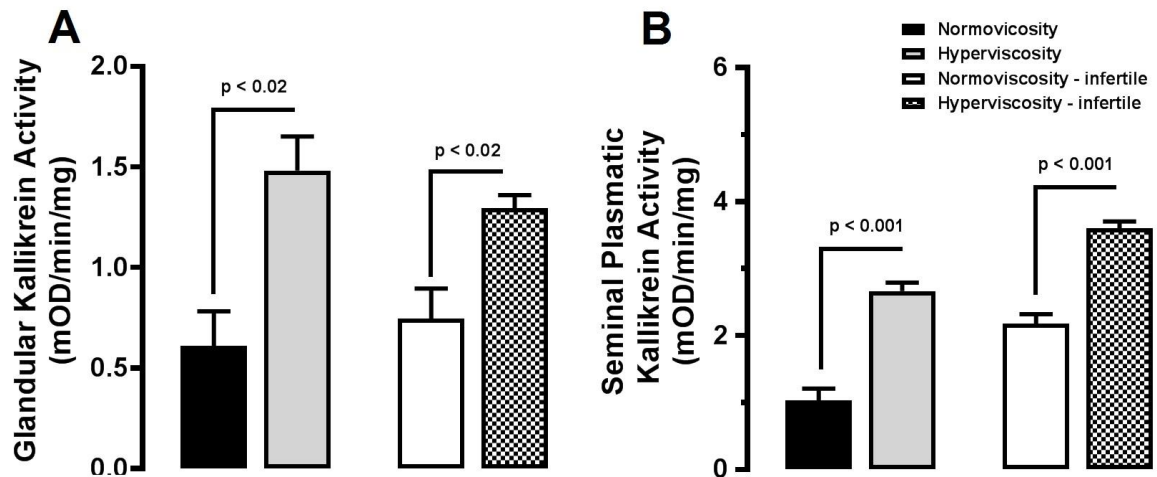
**Fig. 3.** Caseinolytic proteinase activity in human seminal plasma. Different protein concentration from the four seminal plasma groups were incubated with azocasein for 30 min. Absorbance of the products were read at 440 nm. (A) Fertile Normoviscous group and Fertile Hyperviscous group. (B) Infertile Normoviscous group and Infertile Hyperviscous group.



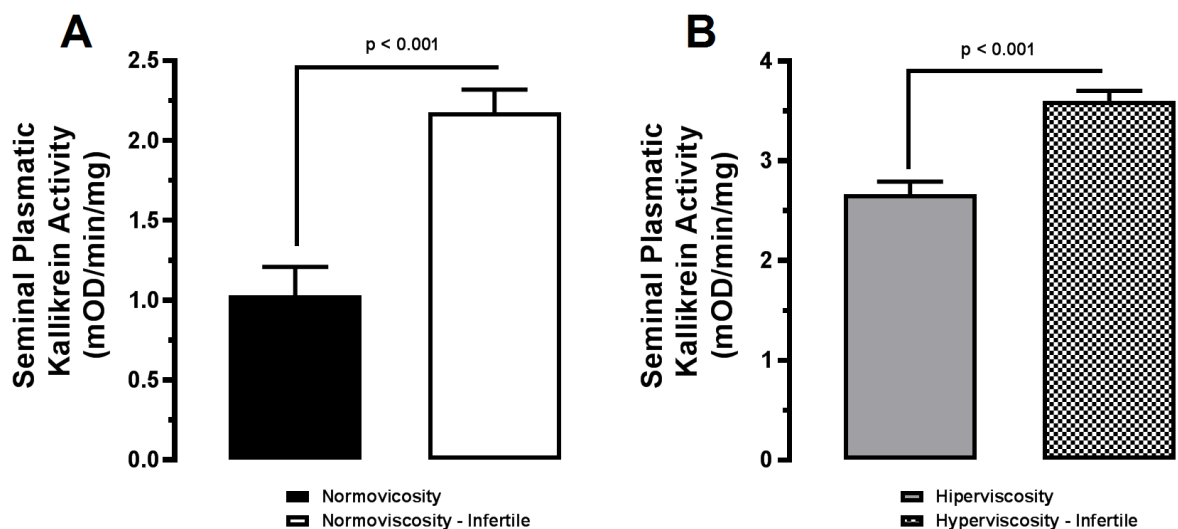
**Fig. 4.** Zymogram of gelatinolytic activity in human seminal plasma. Proteins (90  $\mu$ g) from four seminal plasma group were electrophoresed in an 8% SDS-PAGE 1% gelatin gel. Seven bands of proteinase activities were detected and numbered 1-7. Lane A: Fertile Normoviscous group; Lane B: Fertile Hyperviscous group; Lane C: Infertile Normoviscous group; Lane D: Infertile Hyperviscous group.

### Kallikrein activity

In the analyses of Kallikrein activity, the activity of both tissue kallikrein and plasmatic kallikrein were significantly increased in hyperviscous semen when comparing with normoviscous semen. This higher activity was present in both fertile and infertile groups. (Fig 6). In addition, there was an increase of the plasmatic kallikrein activity in infertile samples when comparing with the fertile samples. (Fig 7)



**Fig. 5.** Kallikrein activity in human seminal plasma. Proteins (100  $\mu$ g) from seminal plasma were incubated with specific substrates for tissue and plasmatic KLKs for 30 min. Colorimetric products were read at 440 nm. (A) Activity of tissue KLKs. (B) Activity of plasmatic KLK.



**Fig. 6.** Plasmatic kallikrein activity in human seminal plasma. Proteins (100  $\mu$ g) from seminal plasma were incubated with specific substrates for plasmatic KLKs for 30 min. Colorimetric products were read at 440 nm. (A) Normoviscosity. (B) Hiperviscosity.

## DISCUSSION

The seminal analyses showed an association of hyperviscosity with seminal characteristics of infertility. Low volume is related with low secretion of prostate and vesicular glands, that together accounts for 90% of the seminal volume; low sperm concentration is a result of spermatogenesis dysfunction in the testis; low motility and vitality are associated with both testis and secretion glands problems. (ANDRADE-ROCHA, 2005; JUYENA; STELLETTA, 2012; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010) In addition, neutrophils concentration was significantly increased in hyperviscous semen. Neutrophils increase is an indication of inflammation or neoplasia in the reproduction system. Neutrophils are also the main source of reactive oxygens species (ROS) in semen, which might result in oxidative stress. Sperm cells are rich in polyunsaturated fatty acids, this way, they are susceptible to oxygen-induced damage, that can cause dysfunctions on cytoplasmic membrane, and hence, motility and other membrane functions. (AGARWAL et al., 2014) Altogether, these results indicate that hyperviscous semen is a low quality semen that probably results in reduced fertilization capacity.

The total mucoprotein quantification showed a tendency in reduced content of these molecules in hyperviscous samples, and a significantly reduce in infertile samples. This alteration also indicates the lower quality of the seminal plasma in hyperviscous semen, because seminal plasma molecules have important roles in a variety of processes over the sperm, like sperm capacitation and protecting sperms against toxins and pathogens. This way, alteration in the content of seminal components cause negative influence on the seminal plasma role over the sperm cells. (GONZALES; KORTEBANI; MAZZOLLI, 1993; JUYENA; STELLETTA, 2012; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010) One possibility for this reduction is sexual glands dysfunction. Sexual glands are responsible for the majority of secretion on semen. Biomarker analyses show decreased secretion of these glands in infertile samples that results in reduced sperm quality, in parameters like motility and viability. (VICKRAM et al., 2016) This same biomarker has been found to be reduced in hyperviscous semen as well, indicating dysfunction in the glands secretion in this group of patients. (ANDRADE-ROCHA, 2005; ELZANATY; RICHTHOFF; GIWERCMAN, 2004) Other possibility is an increase of degradation by proteases. Semen is rich in proteolytic enzymes and it is possible that some enzymes have the ability to degrade mucoproteins and

are presenting in an increased level of activity in hyperviscous semen as well. Our results showed a higher activity of protease enzymes in infertile and in hyperviscous seminal plasma.

Gel-forming mucins are a group of mucoproteins that has the characteristic of increase the secretions' viscosity in gastrointestinal and respiratory systems. (BOLTIN et al., 2013; JOHANSSON; SJÖVALL; HANSSON, 2013) Three of them (MUC5, MUCAC, MUC6) are present in the masculine reproductive system, and they have molecular weights above than 250 kDa. (RUSSO et al., 2006) In animals, MUC5 concentration showed correlation with increased semen viscosity. (KERSHAW-YOUNG; MAXWELL, 2012) However, in our study, the 1D gradient SDS-PAGE gel was not able to detect the gel-forming mucins band. Probably, the mucins have no high concentration as PSA and albumin, which can be visualized at the 1D gel.

The well-visualized bands in the SDS-PAGE gel represent the most abundant protein present in seminal plasma semen: 78 kDa band (lactoferrin), 70 kDa band (albumin), 50 kDa band (prostatic acid phosphatase, PAP), 43 kDa band (clusterin and Zn- $\alpha$ -2-glycoprotein), 30 kDa band (prostate specific antigen, PSA), and 20-10 kDa (semenogelin I and II's products of degradation). (FUNG et al., 2004) An earlier study had shown that the protein distribution in SDS-PAGE gel between 10 – 100 kDa is similar between normoviscous and hyperviscous seminal plasma samples. (CARPINO; SICILIANO, 1998) Here, we found no differences in the patterns of protein distribution in 1D SDS-PAGE gel above 100 kDa as well.

We found a difference in the caseinolytic activity between normoviscous and hyperviscous seminal plasma of the fertile groups, indicating that hyperviscosity is associated with alteration of the activity of some enzymes in semen. Yin et al developed seminal protein separation by gel filtration chromatography and the protease activity towards casein was found in a range of molecular weight from 10 to 70 kDa. (YIN et al., 1990). A known source of the caseinolytic enzymes in semen is the prostate gland; and pathologies affecting the prostate change the profile of the caseinolytic enzymes in the prostate secretion. (WILSON et al., 1993) This way, an alteration of these enzymes in hyperviscous semen can be an indication of alteration of the physiology of the prostate gland. In the infertile groups, there were no differences between the groups, but probably the infertility alterations are causing alteration of the activities of these enzymes as well, similar to what was seen in the gelatinolytic activity analysis.

Previous studies have shown that gelatinolytic assay with seminal plasma detects matrix metalloproteases (MMPs). (MÉTAYER et al., 2002; SHIMOKAWA KI et al., 2002) We found that, although all the groups showed the same bands, five band were more intense

in hyperviscous fertile group than in normoviscous fertile group. This result indicates that hyperviscosity is characterized by alterations in secretion and activity of MMPs. These five bands were also more intense in infertile groups, both hyperviscous and normoviscous, indicating that infertility also alters the amount and activity of these enzymes. Yin et al have already analyzed enzyme activity in normoviscous and hyperviscous sample through gelatin zymography and they found that both groups have the same bands patterns on the gel. However, they did not compare the intensity of the bands, because they developed different incubation protocols to maximize activity of individual proteinase to optimize their detection. (YIN et al., 1990).

Previous studies have also shown that MMPs secretion and activation are stimulate by tissue KLKs. (GAO et al., 2010; KALINSKA et al., 2016) Our study revealed that hyperviscous semen from both fertile and infertile groups had a significant increase in tissue KLKs activity. This way, we suggest that the increase of metalloproteases in hyperviscous semen is a consequence of the higher tissue KLKs activity in these samples.

Normoviscous infertile group has the same five bands with higher activity seen in the hyperviscous group when comparing with normoviscous fertile group. Tentés *et al* had previously found that oligospermic samples have increased concentration of MMP9, but no alteration on MMP2 content, indicating that alteration of the seminal parameters influences in the MMP content and activity. (TENTES et al., 2007) Our infertile samples are characterized with a mix of seminal parameters alteration, and not only low spermatozoon concentration, that can explain the more prominent alteration on the metalloproteases content, resulting in an increase of more than one type of them. The mechanism that is responsible for this increasing is different from the one seen in hyperviscous semen, because there is no tissue KLK increased activity in the normoviscous infertile samples.

The tissue KLK analyses revealed that the activity of these KLKs is increased exclusively in hyperviscous samples. The source of these enzymes on semen is the prostate gland, this way it is possible that an increased seminal activity can be inferring an inflammation process in this gland. In the opposition to our results, Emami *et al* have found that tissue KLKs are present in the same or at low concentration in hyperviscous semen. (EMAMI et al., 2009) One explanation for this can be an alteration in the regulator factors' concentration, resulting in increased activator factors or decreased inhibitor factors concentration. In fact, Andrade-Rocha have found that zinc ion, an tissue KLK inhibitor prevenient from the prostate, shows a reduced concentration in hyperviscous semen. (ANDRADE-ROCHA, 2005)

Although this analyses did not detect the chymotrypsin-like KLK3, which is the main enzyme involved in the clot degradation, other tissue KLKs also have the ability of degrading the coagulum. (KALINSKA et al., 2016; VEVERIS-LOWE et al., 2007) An increased activity of tissue KLK becomes likely that the proteins involved in the coagulum are been degraded. This indicates that semenogelins and other clot proteins are probably not participating of the hyperviscosity status. Also, semen's incubation at 37 °C for 7 h gave enough time for proteins to clot, but this incubation did not alter the viscosity characteristics of the hyperviscous semen, also indicating that degradation of the proteins clot is not involved in the hyperviscosity characteristic. Esfandiari *et al* analyzed the semenogelin degradation in hyperviscous semen, and they did not find any difference with the level of semenogelin degradation seen in normoviscous seminal plasma. (ESFANDIARI et al., 2014)

Plasmatic kallikrein is present in testis and prostate. In the prostate, it is expressed in ducts' and acinis' epithelial cells, been the source of the enzyme in semen. In the testis, its expression is 4 times higher than in prostate, but the enzyme is only expressed in Leydig cells, and its presence is absent in the seminiferous tubules. (FINK et al., 2007; NETH et al., 2001) Our analyses showed that KLKB1 is significantly more active in hyperviscous semen. Considering KLKB1 has a role in inducing inflammation, its increased activity in hyperviscous semen is one more indication of inflammatory response happening in the prostate.

Additionally, there was an increase in the KLKB1 activity in the infertile groups, when comparing with the fertile ones. Since, this increase is not along with tissue KLK in infertile normoviscous semen, one hypothesis is that the KLKB1 in these samples are coming from the testis. One characteristic of infertile's sample is a dysfunction in the spermatogenesis that results in reduced sperm cell in the semen. This way, the testicular alteration that is resulting spermatogenesis dysfunction may also promotes testicular damages, resulting in overflow of the enzymes from interstice to the seminiferous tubules. The other hypothesis is the damage in the testis is releasing activator factors to the lumen, therefore activating the KLKB1 secreted by the prostate. Independently of the molecular mechanism, the differential activity between fertile and infertile seems to be associated with testicular dysfunction. This way, it could be investigated as a potential biomarker of testis dysfunction.

## CONCLUSION



Our study found decreased seminal parameters, mucoprotein composition, and increase enzymes activities in hyperviscous semen, indicating dysfunction in the normal physiology of the male reproduction system in these patients. The increase of the metalloprotease and kallikreins activities suggest an inflammation process in the prostate gland of the patients with hyperviscous semen. In addition, these enzymes have the capacity of degrading extracellular matrix, suggesting that seminal coagulum liquefaction is not lacking. Besides that, plasmatic kallikrein revealed an increased activity in infertile samples, which should be more investigated for its use as a biomarker of testis function.

## ACKNOWLEDGMENTS

FIPE-HCPA, CNPq, CAPES have supported this research.

## CONFLICT OF INTEREST

The Authors declare that they have no conflict of interest.

## REFERENCES

AGARWAL, A. et al. Effect of Oxidative Stress on Male Reproduction. **The World Journal of Men's Health**, [s. l.], v. 32, n. 1, p. 1, 2014. Disponível em: <<https://synapse.koreamed.org/DOIx.php?id=10.5534/wjmh.2014.32.1.1>>

ANDRADE-ROCHA, F. T. Physical analysis of ejaculate to evaluate the secretory activity of the seminal vesicles and prostate. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, [s. l.], v. 43, n. 11, p. 1203–1210, 2005.

AYDEMIR, B. et al. The Influence of Oxidative Damage on Viscosity of Seminal Fluid in Infertile Men. **Journal of Andrology**, [s. l.], v. 29, n. 1, p. 41–46, 2008. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.2164/jandrol.107.003046>>

BOLTIN, D. et al. Mucin Function in Inflammatory Bowel Disease An Update. **J Clin Gastroenterol**, [s. l.], v. 47, n. 2, p. 106–111, 2013.

CARPINO, A.; SICILIANO, L. Unaltered protein pattern/genital tract secretion marker levels in seminal plasma of highly viscous human ejaculates. **Archives of Andrology**, [s. l.], v. 41, n. 1, p. 31–35, 1998.

CHARNEY, J.; TOMARELLI, R. A COLORIMETRIC METHOD FOR THE

DETERMINATION OF THE PROTEOLYTIC ACTIVITY OF DUODENAL JUICE. **The Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], n. 171, p. 501–505, 1947.

CLAESON, G. et al. Designing of Peptide Substrates Different Approaches Exemplified by New Chromogenic Substrates for. [s. l.], v. 68, p. 62–68, 1978.

DUBK, J. Y.; GAUDREAU, D.; TREMBLAY, R. R. The Concentration of Immunoreactive Prostate Specific Antigen is not Decreased in Viscous Semen Samples Keine Konzentrationsverminderung des immunoreaktiven Prostata-spezifischen Antigens in viskosen Ejakulaten. [s. l.], v. 139, n. 2, p. 136–139, 1989.

ELIA, J. et al. Human semen hyperviscosity: prevalence, pathogenesis and therapeutic aspects. **Asian Journal of Andrology**, [s. l.], v. 11, n. 5, p. 609–615, 2009. Disponível em: <[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=19701219%5Cnhttp://www.asiaandro.com/Abstract.asp?doi=10.1038/aja.2009.46](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19701219%5Cnhttp://www.asiaandro.com/Abstract.asp?doi=10.1038/aja.2009.46)>

ELZANATY, S.; RICHTHOFF, J.; GIWERCMAN, A. Visco-elasticity of seminal fluid in relation to the epididymal and accessory sex gland function and its impact on sperm motility. **international journal of andrology**, [s. l.], n. 27, p. 94–100, 2004.

EMAMI, N. et al. Association between kallikrein-related peptidases (KLKs) and macroscopic indicators of semen analysis: Their relation to sperm motility. **Biological Chemistry**, [s. l.], v. 390, n. 9, p. 921–929, 2009.

ESFANDIARI, N. et al. Seminal hyperviscosity is associated with poor outcome of in vitro fertilization and embryo transfer: a prospective study. **Fertility and Sterility**, [s. l.], v. 90, n. 5, p. 1739–1743, 2008. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.fertnstert.2007.09.032>>

ESFANDIARI, N. et al. Seminal hyperviscosity is not associated with semenogelin degradation or sperm deoxyribonucleic acid damage: A prospective study of infertile couples. **Fertility and Sterility**, [s. l.], v. 101, n. 6, p. 1599–1603, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.fertnstert.2012.07.885>>

ESFANDIARI, N.; GOTLIEB, L.; CASPER, R. . Seminal hyperviscosity is associated with poor outcome of controlled ovarian stimulation and intrauterine insemination: a prospective study. **Int J Fertil Womens Med**, [s. l.], n. 51, p. 21–27, 2006.

FINK, E. et al. Cellular expression of plasma prekallikrein in human tissues. **Biological Chemistry**, [s. l.], v. 388, n. 9, p. 957–963, 2007.

FUNG, K. Y. C. et al. A comprehensive characterization of the peptide and protein constituents of human seminal fluid. **The Prostate**, [s. l.], v. 61, n. 2, p. 171–181, 2004. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/pros.20089>>

GAO, L. et al. Tissue kallikrein promotes prostate cancer cell migration and invasion via a protease-activated receptor-1-dependent signaling pathway. **Biological chemistry**, [s. l.], v. 391, n. 7, p. 803–812, 2010.

GONZALES, G. F.; KORTEBANI, G.; MAZZOLLI, A. B. HYPERVISCOSITY AND HYPOFUNCTION OF THE SEMINAL VESICLES Semen Quality in Relation to Viscosity of Semen. [s. l.], v. 68, p. 63–68, 1993.

GOPALKRISHNAN, K.; PADWAL, V.; BALAIAH, D. Does seminal fluid viscosity influence sperm chromatin integrity? **Systems Biology in Reproductive Medicine**, [s. l.], v. 45, n. 2, p. 99–103, 2000.

HADLER-OLSEN, E.; WINBERG, J. O.; UHLIN-HANSEN, L. Matrix metalloproteinases in cancer: Their value as diagnostic and prognostic markers and therapeutic targets. **Tumor Biology**, [s. l.], v. 34, n. 4, p. 2041–2051, 2013.

HERWIG, R. et al. Proteomic analysis of seminal plasma from infertile patients with oligoasthenoteratozoospermia due to oxidative stress and comparison with fertile volunteers. **Fertility and Sterility**, [s. l.], v. 100, n. 2, p. 355–366.e2, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.fertnstert.2013.03.048>>

HEUSSEN, C.; DOWDLE, E. B. Electrophoretic analysis of plasminogen activators in polyacrylamide gels containing sodium dodecyl sulfate and copolymerized substrates. **Analytical Biochemistry**, [s. l.], v. 102, n. 1, p. 196–202, 1980.

JOHANSSON, M. E. V.; SJÖVALL, H.; HANSSON, G. C. The gastrointestinal mucus system in health and disease. **Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology**, [s. l.], v. 10, n. 6, p. 352–361, 2013.

JUYENA, N. S.; STELLETTA, C. Seminal plasma: An essential attribute to spermatozoa. **Journal of Andrology**, [s. l.], v. 33, n. 4, p. 536–551, 2012.

KALINSKA, M. et al. Kallikreins - the melting pot of activity and function. **Biochimie**, [s. l.], n. 122, p. 1-21270–282, 2016.

KERSHAW-YOUNG, C. M.; MAXWELL, W. Seminal plasma components in camelids and comparisons with other species. **Reproduction in Domestic Animals**, [s. l.], v. 47, n. SUPPL.4, p. 369–375, 2012.

LAYALI, I. et al. Total antioxidant capacity and lipid peroxidation in semen of patient with hyperviscosity. **Cell Journal**, [s. l.], v. 16, n. 4, p. 554–559, 2015.

MADALA, P. K. et al. Update 1 of: Proteases universally recognize beta strands in their active sites. **Chemical Reviews**, [s. l.], v. 110, n. 6, p. PR1-PR31, 2010.

MARGOLIS, J.; KENRICK, K. G. Polyacrylamide gel-electrophoresis across a molecular sieve gradient [18]. **Nature**, [s. l.], v. 214, n. 5095, p. 1334–1336, 1967.

NETH, P. et al. The mRNAs of prekallikrein, factors XI and XII, and kininogen, components of the contact phase cascade are differentially expressed in multiple non-hepatic human tissues. **Thrombosis and Haemostasis**, [s. l.], v. 85, n. 6, p. 1043–1047, 2001.

SICILIANO, L. et al. Impaired seminal antioxidant capacity in human semen with hyperviscosity or oligoasthenozoospermia. **Journal of andrology**, [s. l.], v. 22, n. 5, p. 798–803, 2001.

TECLES, F.; MARTÍNEZ-SUBIELA, S.; CERÓN, J. J. Optimization of a spectrophotometric method for quantification of acid-soluble glycoprotein in porcine serum. **Canadian Journal of Veterinary Research**, [s. l.], v. 71, n. 3, p. 161–164, 2007.

TENTES, I. et al. Matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 in seminal plasma. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, [s. l.], v. 24, n. 7, p. 278–281, 2007.

VEVERIS-LOWE, T. L. et al. Seminal fluid characterization for male fertility and prostate cancer: Kallikrein-related serine proteases and whole proteome approaches. **Seminars in Thrombosis and Hemostasis**, [s. l.], v. 33, n. 1, p. 87–99, 2007.

VICKRAM, A. S. et al. Validation of artificial neural network models for predicting biochemical markers associated with male infertility. **Systems Biology in Reproductive Medicine**, [s. l.], v. 62, n. 4, p. 258–265, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1080/19396368.2016.1185654>>

WILSON, M. J. et al. Gelatinolytic And Caseinolytic Proteinase Activities In Human Prostatic Secretions. **The Journal of Urology**, [s. l.], v. 149, n. 3, p. 653–658, 1993. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022534717361736>>

WINZLER, R. J. Determination of serum glycoproteins. **Meth Biochem Anal**, [s. l.], v. 2, n. 206, p. 279–307, 1955.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Examination and processing of human semen. **WHO laboratory manual**, [s. l.], v. 5th Editio, 2010.

YIN, H. et al. Gelatinolytic proteinase activities in human seminal plasma. [s. l.], n. 81, p. 491–501, 1990.

YOSHIDA, K. et al. Physiological roles of semenogelin I and zinc in sperm motility and semen coagulation on ejaculation in humans. **Molecular Human Reproduction**, [s. l.], v. 14, n. 3, p. 151–156, 2008.

## 6 DISCUSSÃO

### 6.1 Análise seminal

Análises do espermograma mostram que a hiperviscosidade seminal está associada com menor qualidade seminal, apresentando vários parâmetros seminais de fertilidade masculina significativamente inferiores e abaixo dos limiares normais de fertilidade. Um dos parâmetros foi a motilidade, onde vários autores notificaram a associação da hiperviscosidade com menor motilidade. Porém, com relação aos demais parâmetros seminais, os resultados de associação são controversos (CARPINO; SICILIANO, 1998; ELZANATY; RICHTHOFF; GIWERCMAN, 2004; GONZALES; KORTEBANI; MAZZOLLI, 1993; LAYALI et al., 2015; ROSSI et al., 2004; SICILIANO et al., 2001). Neste estudo, encontramos que volume seminal, concentração de espermatozoides, espermatozoides totais do ejaculado e vitalidade também estão reduzidos em sêmen hiperviscoso. Redução do volume está associado com menor secreção das glândulas da próstata e das vesículas seminais, que juntas respondem a 90% do volume seminal. Menor quantidade de espermatozoides indica que o quadro de hiperviscosidade está associado com problemas testiculares, que estão resultando em falhas na espermatogênese. Motilidade e vitalidade reduzidas estão associados tanto com problemas na espermatogênese, quanto a disfunções nas secreções das glândulas sexuais, já que constituintes dessas secreções agem no metabolismo e na manutenção da viabilidade dos espermatozoides. (ANDRADE-ROCHA, 2005; ANDROLOGY AUSTRALIA, 2014; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010).

Neutrófilos são os leucócitos predominantes no sêmen. Aumento de neutrófilos pode resultar em baixa qualidade dos espermatozoides, pois neutrófilos são as principais fontes de radicais livre que prejudicam membranas, DNA e motilidade dos espermatozoides. (AGARWAL et al., 2014). Além disso, aumento de neutrófilos está associado com quadro de inflamação no sistema reprodutor masculino (AUSMEES et al., 2014) Nas amostras deste estudo, sêmens hiperviscosos apresentam concentrações significativamente maiores desses granulócitos que sêmens de viscosidade normal:  $0,7 \times 10^6$  neutrófilos em hiperviscosos, contra  $0,06 \times 10^6$  em normoviscosos. De acordo com o Manual de Examinação e Processamento de Sêmen Humano da OMS (5ª Ed), concentração de  $1 \times 10^6$ /mL de neutrófilos é o limiar entre normal e quadro de inflamação no trato reprodutor. Nos espermogramas avaliados, duas amostras apresentavam concentrações acima desse limiar e ambos eram hiperviscosos; e as demais amostras hiperviscosas apresentam concentrações abaixo desse valor. Entretanto, o grupo

hiperviscoso continuou apresentando concentrações significativamente maiores de granulócitos, mesmo quando as duas amostras leucospérmicas foram removidas das análises (Dado não mostrado). O próprio Manual afirma que o valor de  $1 \times 10^6/\text{mL}$  de neutrófilos pode não ser o mais adequado como limiar de indicador de inflamação e vários autores encontram associação com inflamação em concentrações inferiores ao limiar. Ausmees *et al* encontraram que um limiar de  $0,35 \times 10^6/\text{mL}$  de neutrófilos discrimina pacientes com alteração inflamatória prostática. (AUSMEES *et al.*, 2013, 2014; SHARMA *et al.*, 2013; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010) Em nosso estudo, esse limiar separa amostras normoviscosas de hiperviscosas, levando-nos a sugerir que algum tipo de inflamação possa estar ocorrendo no trato reprodutor masculino nos pacientes com sêmen hiperviscoso.

Assim, os resultados dos espermogramas desse estudo encontram associação entre hiperviscosidade e parâmetros seminais característicos de infertilidade, indicando que sêmens hiperviscosos apresentam menor qualidade para alcançar a fertilização. Além disso, a maior infiltração de neutrófilos no sêmen sugere inflamação no trato reprodutor masculino.

## 6.2 Mucoproteínas

Mucoproteínas (ou glicoproteínas ácidas) constituem uma grande variedade de proteínas altamente glicosiladas, que se diferenciam das demais glicoproteínas por sua maior composição de carboidratos e por diferenças de solubilidade em meios ácidos (TECLES; MARTÍNEZ-SUBIELA; CERÓN, 2007; WINZLER, 1955). Mucoproteínas são secretadas por todos os órgãos e dutos do sistema reprodutor masculino; todavia, pouco se sabe sobre a diversidade dessa composição mucoproteica seminal e qual a função dessas moléculas no sêmen (RUSSO *et al.*, 2006). Na análise de quantificação de mucoproteínas totais no sêmen, houve uma diminuição do conteúdo total mucoproteico nas amostras hiperviscosas, sendo que essa diminuição foi significativa quando comparado normoviscoso infértil com hiperviscoso infértil. Diminuição do conteúdo mucoproteico também está associada com infertilidade, pois também houve uma redução significativa quando foi comparada amostra fértil x infértil. Embora não se conheça as funções dessas moléculas, essa grande diferença de composição possivelmente está resultando em um impacto negativo na qualidade seminal dessas amostras, pois as duas principais funções dos componentes do plasma seminal são manter a viabilidade dos espermatozoides e controlar o metabolismo desses gametas. (DU PLESSIS; GOKUL; AGARWAL, 2013)

Duas hipóteses são levantadas para essa diminuição mucoproteica. A primeira hipótese é que está ocorrendo uma menor secreção desses componentes mucoproteicos em pacientes com sêmen hiperviscoso e em pacientes inférteis. Alguns autores encontraram que sêmens hiperviscosos apresentam menor concentração de alguns biomarcadores de próstata e vesículas seminais. Eles sugerem que, nesses pacientes, pode estar ocorrendo disfunção na secreção dessas glândulas. (ANDRADE-ROCHA, 2005; ELZANATY; RICHTHOFF; GIWERCMAN, 2004; GONZALES; KORTEBANI; MAZZOLLI, 1993) Quadros de infertilidade também se caracterizam por apresentar alterações no trato reprodutor masculino que resultam em menor secreção de componentes plasmáticos, explicando a menor concentração de mucoproteínas nas amostras desses pacientes. (VICKRAM et al., 2016; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010)

A segunda hipótese é que enzimas com capacidade mucoprotease possam estar presentes em maior concentração ou estar apresentando uma maior atividade enzimática nas amostras hiperviscosas nas dos pacientes inférteis. Essa hipótese vem a partir dos resultados das análises proteolíticas desenvolvidas neste estudo, em que amostras hiperviscosas e amostras de pacientes inférteis apresentam maior atividade de algumas proteases. Uma maior quantidade e atividade de enzimas com capacidade mucoprotease, pode estar resultando em redução do conteúdo total das glicoproteínas ácidas. Essa hipótese pode ser analisada através da mensuração da atividade de enzimas como tripsina e  $\alpha$ -amilase no plasma seminal.

Como há pouco conhecimento sobre a composição de mucoproteínas seminais, mais estudos devem ser desenvolvidos para se identificar quais são essas glicoproteínas ácidas que compõem o sêmen e que estão reduzidas nos quadros de hiperviscosidade seminal e de infertilidade seminal. Esse conhecimento auxiliará a entender que disfunções estão ocorrendo no sistema reprodutor masculino e como isso está afetando a qualidade seminal.

Um grupo de mucoproteínas presente no sêmen é o das mucinas, que são as mucoproteínas mais estudadas no corpo. Elas estão presentes em diversas secreções exócrinas corporais e revestindo mucosas dos tratos gastrointestinal, respiratório, urinário e reprodutor. Apresentam como funções: proteção física de lubrificação, proteção química contra agentes ácidos e tóxicos, e proteção imunológica inata de barreira e aprisionamento de patógenos. Elas se caracterizam por apresentam repetições em tandem da sequência dos aminoácidos de serina-prolina-treonina, que geram sítios de glicosilação, e o conteúdo total de carboidratos representa 80% do peso molecular. (BOLTIN et al., 2013; JOHANSSON; SJÖVALL; HANSSON, 2013; RUSSO et al., 2006). Mucinas são bastante estudadas nos sistemas

digestório, respiratório e reprodutor feminino. No trato gastrointestinal humano, inflamações agudas causam aumento da secreção de mucinas gel-forming, induzidas tanto por fatores imunológicos, quanto pelos patógenos. Entretanto, em infecções crônicas, ocorre depleção dessas mucoproteínas. Esse quadro é principalmente em decorrência da danificação e morte das células secretoras de mucinas. Outro fator que também influencia na diminuição é a secreção de glicosidades e proteases microbianas com capacidade mucinolítica (BOLTIN et al., 2013; KIM; HO, 2010).

Existem 21 moléculas diferentes de mucinas, das quais 5 são gel-forming. As mucinas gel-forming se caracterizam por formarem multimerizações, que resultam em aumento da viscosidade das secreções em que estão presentes. São elas, MUC2, MUC5B, MUC5AC, MUC6, MUC19 (BOLTIN et al., 2013; JOHANSSON; SJÖVALL; HANSSON, 2013; RUSSO et al., 2006) Estudos em alpacas e lhamas revelaram que sêmens hiperviscosos apresentam um conteúdo de MUC5B cinco vezes maior que os sêmens de viscosidade normal, e que a remoção das glândulas bulbouretrais, de onde são secretadas, resulta na normalização da viscosidade seminal nos animais que apresentavam hiperviscosidade seminal. Esses estudos sugerem que a elevação do conteúdo de MUC5B está envolvido no aumento da viscosidade no sêmen (APICHELA et al., 2014; KERSHAW-YOUNG; MAXWELL, 2012). No trato reprodutor masculino, Russo et al 2006 fez análises para detecção de 14 mucinas no trato reprodutor masculino, na qual incluiu as 5 mucinas gel-forming. Detectou a presença de 10 mucinas, das quais 3 são gel-forming: MUC5B, MUC5AC, MUC6. Identificou que a MUC5B é secretada pelas glândulas bulbouretrais; e as MUC5AC e MUC6 são secretadas por diversos tecidos do sistema, incluindo próstata e vesículas seminais. Essas três mucinas foram caracterizadas por apresentarem tamanhos moleculares superiores a 250 kDa no sêmen (RUSSO et al., 2006).

Embora o resultado de mucoproteínas totais tenha mostrado diminuição do conteúdo mucoproteico total em amostras hiperviscosas, alguns constituintes individuais (como as mucinas gel-forming) podem estar com suas concentrações elevados nas amostras hiperviscosas. Assim, análise de gradiente SDS-PAGE 1D foi realizada para ver a possibilidade de visualizar a banda das mucinas nas amostras; já que proteínas com altas concentrações no plasma seminal formam bandas bastante intensas nessa análise. Entretanto, a técnica não foi sensível para a detecção dessas mucinas e não houve visualização de nenhuma banda com tamanho de 250 kDa ou mais. A maior banda visualizada nos géis apresentava 150 kDa.



Algumas estratégias que podem ser tomadas para se tentar detectar essas mucinas futuramente são citadas a seguir. Aumentar a quantidade de proteína utilizada na eletroforese; pois aqui nesse estudo foram utilizados 75 µg, outros artigos desenvolveram essa técnica utilizando 200 µg de proteína. Desenvolver coloração de prata, que tem maior sensibilidade que a coloração de Coomassie blue e possibilita a detecção de proteínas com menor concentração. Desenvolver SDS-PAGE bidimensional, que permite a utilização de quantidades muito maiores de proteína (500 µg) e uma separação proteica adicional por ponto isoelétrico, que resulta num resultado mais sensível e discriminativo. Porém, as técnicas mais sensíveis e específicas para a detecção dessas mucinas são o desenvolvimento de ELISA ou Western Blot com anticorpos específicos para essas mucinas gel-forming (FUNG et al., 2004; MAO et al., 2013; WANG et al., 2014).

O perfil de distribuição proteica no gel 1D também não evidenciou nenhuma grande alteração na distribuição das bandas entre amostras normoviscosas e hiperviscosas. Carpino *et al* já haviam feito uma análise por SDS-PAGE para extensão de 10 a 100 kDa e relataram não ter encontrado diferença na distribuição das bandas entre amostras normoviscosas e hiperviscosas nessa extensão (CARPINO; SICILIANO, 1998). Aqui, encontramos que acima de 100 kDa também não há diferenças de bandas nessa técnica. As bandas mais intensas encontradas no gel são principalmente de: 140 kDa (desconhecido); 78 kDa: lactoferrina; 70 kDa: Albumina; 50 kDa: precursor de fosfatase ácida prostática; 43 kDa: clusterina e Zn-α-2-glicoproteína; 30 kDa: PSA; 20-10 kDa: produtos de degradação de Seminogelinas I e II (FUNG et al., 2004).

### 6.3 Proteases

Proteases são enzimas que clivam ligações peptídicas, controlando a ação e função das proteínas no corpo. Muitas dessas enzimas têm atividade finamente controlada através de cascatas de ativação, semelhante ao visto na cascata de ativação dos fatores de coagulação sanguínea. Elas estão envolvidas em muitos processos fisiológicos essenciais dos organismos, por exemplo, na regulação do ciclo celular e proliferação, crescimento e diferenciação celular, migração celular, sinalização celular, apoptose, homeostasia tecidual, inflamação tecidual, apresentação de antígenos, liberação de citocinas, fagocitose, entre outros. Assim, problemas na expressão ou no controle da atividade das proteases estão relacionadas com diversas patologias, incluindo infecções e neoplasias. Entretanto, muitos estudos ainda devem ser

feitos para entender a ação das proteases nas patologias, pois muitos dos substratos fisiológicos dessas enzimas ainda são desconhecidos. (CERA, 2009; MADALA et al., 2010).

Proteases são classificadas em seis classes com base no resíduo presente no sítio catalítico, que ataca a ligação peptídica. As classes e suas proporções são: metaloproteases (34%), serina proteases (30%), cisteína proteases (26%), ácido aspártico proteases (4%), treonina proteases (5%) e glutamato proteases (1%) (HEDSTROM, 2002; MADALA et al., 2010; NEITZEL et al., 2010).

Diferentemente das demais classes, as metaloproteases apresentam um íon de  $Zn^{2+}$  que ataca a ligação peptídica, ao invés de um resíduo. Exemplo de metaloproteases são as metaloproteases de matriz (MMPs) que estão envolvidas na degradação de matriz extracelular em processos fisiológicos e patológicos. (MADALA et al., 2010; NEITZEL et al., 2010).

Serina proteases apresentam uma serina como resíduo nucleofílico que ataca a ligação peptídica. Além da serina, outros dois resíduos agem na ação proteolítica formando a tríade catalítica, sendo a tríade mais frequente formada por: Asp102-His57-Ser195. Outros resíduos participam da formação do sítio ativo gerando cargas e pontes que resultam na especificidade enzimática. Quimotripsina-like/tripsina-like é o subgrupo mais abundante de serina proteases. Quimotripsina-like apresenta resíduos hidrofóbicos no sítio ativo da enzima, assim, clivam com maior afinidade resíduos com cadeias laterais hidrofóbicas, como fenilalanina, triptofano e tirosina. Tripsina-like apresentam resíduos negativos no sítio ativo, assim, clivam com maior afinidade em resíduos com cadeias laterais positivas, como arginina e lisina. Exemplo de serina proteases são as calicreínas, que são tripsina-like; exceto a calicreína KLK3, que é quimotripsina-like (CERA, 2009; HEDSTROM, 2002; KALINSKA et al., 2016; MADALA et al., 2010; NEITZEL et al., 2010).

### 6.3.1 - Análise Caseinolítica

Há poucos estudos que analisaram atividade caseinolítica no sistema reprodutor masculino, tanto em seres humanos, como em animais (CEJKO et al., 2016; THURSTON et al., 1993; WILSON et al., 1993; YIN et al., 1990). Próstata é o principal local de síntese e secreção das caseinases presentes no sêmen. Diversas bandas enzimáticas (26 bandas) já foram detectadas em zimografia de caseína com secreção prostática, com tamanhos entre 10 – 150 kDa. Metade das enzimas foram identificadas como sendo metaloproteases ou serina proteases e a frequência das enzimas identificadas se altera em diferentes quadros de patologia prostática (WILSON et al., 1993). Em plasma seminal humano, estudos com

separação proteica por cromatografia revelaram que caseinases apresentam tamanhos entre 10 – 70 kDa, sendo que a maior parte da atividade caseinase se encontra em torno do tamanho molecular de 35 kDa (YIN et al., 1990).

Nossa análise de atividade caseinolítica encontrou diferença nessa atividade entre as amostras férteis normoviscosas e hiperviscosas, com aumento de atividade enzimática nas amostras hiperviscosas. Uma vez que próstata é a fonte dessas enzimas no sêmen e diversidade de caseinases se altera em patologias envolvendo a próstata; hipotetizamos que a alteração de atividade caseinolítica em sêmen fértil hiperviscoso pode inferir alteração da fisiologia normal dessa glândula. Entre as amostras inférteis não houve diferença. Uma hipótese é que, como infertilidade é resultante de múltiplas causas que geram alterações no sistema reprodutor masculino, é possível que as alterações moleculares resultantes da infertilidade possam estar mascarando as alterações caseinolíticas no sêmen hiperviscoso.

Para se compreender mais as alterações caseinólíticas que estão ocorrendo em sêmens hiperviscosos, pode-se desenvolver zimografia utilizando caseína como substrato. A técnica irá informar quantas variedades de enzimas caseinolítica estão presentes na amostra com diferentes viscosidades, com seus respectivos tamanhos e quantidades. (VANDOOREN et al., 2013) Na zimografia, as classes enzimáticas podem ser identificadas através da adição de inibidores específicos no tampão de renaturação proteica após a eletroforese (Tampão Triton X100). As bandas que somem com a incubação do inibidor, indicam que a enzima pertence à classe de enzimas inibidas por aquele inibidor. Os dois inibidores mais utilizados nessa técnica são: EDTA (inibidor de metaloproteases) e benzamidina (inibidor de serina proteases) (CEJKO et al., 2016; MÉTAYER et al., 2002; WILSON et al., 1993). O uso de inibidores específicos de serina protease e metaloproteases na zimografia podem ser utilizados para classificação das caseinases encontradas, dando mais informações sobre as caseinases seminais.

### 6.3.2 - Análise Gelatinolítica

Em nosso estudo foram detectadas 7 bandas com tamanhos que variam de 15 kDa a quase 200 kDa. Outros estudos com plasma seminal humano já reportaram até 12 bandas em zimografia de gelatina, que foram caracterizadas como sendo da classe das metaloproteases (MMPs) de origem prostática (BAUMGART et al., 2002; SHIMOKAWA KI et al., 2002; TENTES et al., 2007; YIN et al., 1990). Duas dessas bandas já foram identificadas como sendo a MMP2 (zimogênio, 72 kDa; e MMP2 ativa, 67 kDa) (SHIMOKAWA KI et al.,

2002). Em nossa análise, as bandas 5 e 4 apresentam tamanhos similares a essas, provavelmente indicando serem a MMP2.

Nossas análises encontraram que as sete bandas detectadas nas amostras normoviscosas, estão também presentes nas amostras hiperviscosas. Porém, nas amostras férteis, cinco dessas bandas apresentaram aumento de concentração nos plasmas hiperviscosos, incluindo as bandas 4 e 5 que representam a MMP2. Yin et al analisaram amostras hiperviscosas por zimografia de gelatina e relataram que as amostras hiperviscosas apresentam as mesmas quantidades de bandas que as amostras normoviscosas. Entretanto, eles não compararam a intensidade das bandas entre amostras normoviscosas e hiperviscosas, porque cada gel foi submetido a diferentes tempos de incubação para maximizar a visualização das bandas, criando viés de intensidade para a comparação (YIN et al., 1990). Nosso estudo corrobora que o número de bandas distintas se mantém em amostras hiperviscosas, e também indica um aumento na quantidade de MMPS. Uma vez que as MMPs do plasma seminal são secretadas pela próstata, esse aumento da atividade das gelatinases sugere alteração prostática nos pacientes com sêmen hiperviscoso.

Uma das vias conhecidas que leva a secreção e ativação de MMPs na próstata é regulada por calicreínas teciduais. Em estudos *in vitro* com células prostáticas viu-se que, a adição de KLKs teciduais ativas no meio resulta em aumento proporcional de secreção e ativação de MMPs pelas células cultivadas (GAO et al., 2010; SOTIROPOULOU; PAMPALAKIS, 2010). Nas análises com KLK teciduais do nosso estudo, houve um aumento significativo de atividade de KLKs teciduais nas amostras hiperviscosas. Assim, sugerimos que o aumento de atividade de KLKs teciduais pode estar induzindo aumento da secreção e ativação das MMPs na próstata dos pacientes com sêmen hiperviscoso.

Ambas amostras inférteis normoviscosa e hiperviscosa também apresentaram uma maior atividade enzimática que o normoviscoso fértil em nossa análise, indicando que tanto a hiperviscosidade, como a infertilidade estão associados com alterações prostáticas. Entretanto, nessas amostras, o aumento da concentração dessas enzimas deve ser por outra via, pois a atividade KLKs teciduais não se mostrou aumentada nas amostras inférteis normoviscosas. O aumento de atividade gelatinolítica nessas amostras inférteis normoviscosas corrobora com os achados de Tentés et al, que encontraram que amostras normoviscosas oligospérmicas apresentam maior atividade de bandas que representam MMP9, quando comparadas com amostras normoviscosas de concentração normal. (TENTES et al., 2007) Diferentemente do nosso estudo, eles não encontraram diferença de atividade nas bandas referentes a MMP2. Uma explicação possível é que em nossas amostras inférteis estão presentes outras alterações

seminais, além da oligospermia. Dessa maneira, é possível que astenospermia e menor vitalidade estejam associadas com maiores alterações na próstata do que só a oligospermia, resultando na alteração na quantidade de mais MMPs.

### 6.3.3 - Atividade de calicreínas

Calicreína (do grego pâncreas) foi o nome dado em 1930 para duas enzimas isoladas no pâncreas, nomeadas de calicreína plasmática (KLKB1) e calicreína tecidual (KLK1). Em 1980, descobriu-se mais duas calicreínas em seres humanos (KLK2 e KLK3) e no ano 2000, encontraram genes para as calicreínas KLKs 4 a 15. Hoje, estão classificadas como duas famílias: plasmática e tecidual. A família plasmática apresenta apenas uma proteína (codificada no cromossomo 4) que é chamada de calicreína plasmática (KLKB1). A família tecidual engloba as demais 15 enzimas (codificadas no cromossomo 19) e são nomeadas de KLK 1 a 15. KLKB1 e KLK1 formam o sistema calicreína-cinina, pois uma de suas propriedades é clivar moléculas de cininogênio, produzindo cininas, que são peptídeos envolvidos em indução de resposta inflamatória. KLKs 2 a 15 não apresentam essa atividade cininogênica e, por isso, formam o sistema de peptídeos relacionados a calicreína. (KALINSKA et al., 2016; LUNDWALL; BRATTSAND, 2008).

As KLKs teciduais são glicoproteínas serina proteases quimotripsina-like/tripsina-like, com tamanhos entre 30-40 kDa. As KLKs teciduais apresentam resíduo negativo de asparagina no sítio ativo, assim, têm afinidade para clivar em resíduos com carga positivas, como arginina e lisina, de forma semelhante a tripsina. A exceção, é a KLK3, que têm resíduos hidrofóbicos no sítio ativo e cliva com afinidade resíduos hidrofóbicos, como, uma atividade semelhante a quimotripsina (KALINSKA et al., 2016; LUNDWALL; BRATTSAND, 2008).

No trato reprodutor masculino, KLKs teciduais estão presentes majoritariamente na próstata, de onde são secretadas para o sêmen. Das 15 KLKs teciduais existentes, 11 estão presentes no plasma seminal: KLK1 e KLK 2,3,5,6,7,8,10,11,13 e 14. (VEVERIS-LOWE et al., 2007). A maioria das KLKs apresenta concentrações inferiores a 1 mg/L no plasma seminal; todavia, a KLK3 se diferencia por ter uma alta concentração seminal, variando de 500 a 3000 mg/L. A principal função da KLK3 é degradar as proteínas que formam o coágulo seminal (seminogelinas I e II), resultando na liquefação do sêmen. (EMAMI et al., 2009; SUZUKI et al., 2007; VEVERIS-LOWE et al., 2007).

As KLKs desempenham várias funções. Uma função que todas as calicreínas teciduais têm em comum é degradar proteínas de matriz extracelulares. Alguns substratos conhecidos são: colágenos I-IV, fibrinogênio, fibronectina, vibronectina, seminogelina, laminina, e-caderina, gelatina, matrigel. KLKs também estimulam secreção e ativação de outras enzimas; por exemplo, metaloproteases de matriz (MMPs), que também são enzimas que degradam matriz extracelular. A KLK1 também cliva cininogênio de baixo peso molecular gerando cininas que induzem inflamação (sistema calicreína-cinina) (COSTA-NETO et al., 2008; DIAMANDIS; YOUSEF, 2001; GAO et al., 2010; LUNDWALL; BRATTSAND, 2008; SOTIROPOULOU; PAMPALAKIS, 2010).

A expressão das KLKs é regulada por esteroides e a atividade enzimática das KLKs é regulada em vários níveis, incluindo regulação transcricional (splicing alternativo, que gera zimogênios normais que podem ser ativados ou zimogênios truncados que não conseguem ser ativados) e regulação pós-traducional (zimogênio, enzima ativa, enzima complexada a inibidores, enzima degradada). A ativação de um tipo de KLK envolve a ativação por parte de outros tipos de KLKs e também de proteases de outras famílias. Acredita-se que, tanto na próstata, como no sêmen, a ativação das calicreínas ocorra na forma de cascata de regulação, semelhante ao visto na coagulação sanguínea (DIAMANDIS; YOUSEF, 2001; KALINSKA et al., 2016; SOTIROPOULOU; PAMPALAKIS, 2010; VEVERIS-LOWE et al., 2007). A atividade dessas enzimas também é controlada por inibição. Dois inibidores conhecidos no sêmen são: Inibidor de Proteína C (PCI) e  $Zn^{2+}$ . O PCI é secretado pelas vesículas seminais, controla a atividade de KLKs e sua atividade pode ser findada através de sua proteólise pela KLK3. Íons de  $Zn^{2+}$  são secretados pela próstata e sua atividade inibitória sobre as calicreínas é regulada através de sua biodisponibilidade entre  $Zn^{2+}$  livre e  $Zn^{2+}$  ligado a proteínas de matriz extracelular presentes no sêmen. (KALINSKA et al., 2016; SUZUKI et al., 2007).

Nesse estudo foi utilizado um substrato para KLK que apresenta arginina no sítio de clivagem, assim, o substrato tem especificidade para as calicreínas do tipo tripsina-like, excluindo-se o KLK3 (KALINSKA et al., 2016). A análise de atividade de KLK tecidual revelou que a atividade dessa enzima está aumentada nas amostras hiperviscosas quando comparado com amostras normoviscosas. Esse resultado foi encontrado tanto em amostras férteis, como nas inférteis. A fonte de KLKs teciduais no sêmen é a próstata; assim, uma explicação para o maior aumento da atividade dessas enzimas pode ser decorrente de um quadro de inflamação prostática, resultando numa maior ativação dessas enzimas.

Emami *et al* encontraram que a concentração da maioria das KLKs teciduais está reduzida em plasmas seminais hiperviscosos, em relação a plasmas normoviscosos (EMAMI

et al., 2009). A explicação para uma maior atividade pode ser um balanço entre os fatores que induzem atividade e os fatores que inibem atividade de KLKs, que no sêmen hiperviscoso está tendendo para uma maior ativação. Andrade-Rocha, por exemplo, encontrou que o  $Zn^{2+}$ , um inibidor prostático de KLKs, apresenta menor concentração nas amostras hiperviscosas. (ANDRADE-ROCHA, 2005).

Muitos autores sugerem que aumento da viscosidade seminal possa ser decorrente de uma liquefação incompleta do coágulo seminal devido a uma redução de proteases. Embora o KLK3, que é a principal enzima que degrada as seminogelinas, não seja detectado nesse ensaio, outras KLKs também têm atividade proteolítica sobre as proteínas do coágulo, como as KLKs 4,5,6,8,13 e 15 (KALINSKA et al., 2016; VEVERIS-LOWE et al., 2007). Nesse estudo foi encontrado uma maior atividade das proteases MMPs e KLKs teciduais tripsina-like, sugerindo que é pouco provável que esteja havendo carência na degradação das proteínas de matriz extracelular seminal. Essa ideia é corroborada com os estudos de Esfandiari et al, que analisou os níveis de degradação de seminogelinas e não encontrou menor nível de degradação dessas proteínas em amostras hiperviscosas com relação às normoviscosas (ESFANDIARI et al., 2014).

Como KLK3 é uma enzima quimotripsina-like, sua atividade pode ser detectada através do uso de outro substrato específico para KLK3: S-2586, Chromogenix. Como perspectiva, essa análise poderia ser desenvolvida no sêmen hiperviscoso para corroborar a teoria de que a hiperviscosidade seminal não é decorrente da deficiência de liquefação do coágulo seminal.

A KLK plasmática (KLKB1) é uma serina protease tripsina-like que participa do processo inflamatório através da clivagem de cininogênio de alto peso molecular, produzindo a cinina bradicinina, peptídeo pró-inflamatório que induz vasodilatação, edema e infiltração leucocitária. KLKB1 também apresenta outra via pró-inflamatória, através da ativação do receptor ativado por proteases (PAR), que estimula a expressão da enzima da ciclo-oxigenase 2 (COX2), resultando na síntese de prostaglandinas E a partir de ácido araquidônico. Prostaglandina E é um lipídio pró-inflamatório, que também induz vasodilatação, edema, infiltração leucocitária. Adicionalmente, KLKB1 também ativa neutrófilos e o sistema completo. Cininases são as enzimas que finalizam as ações das cininas, degradando-as. (COSTA-NETO et al., 2008; FINK et al., 2007; HAYAMA et al., 2016; NETH et al., 2001).

Na corrente sanguínea, KLKB1 também participa das cascatas de coagulação e fibrinólise sanguínea, ativando fatores de coagulação e plasminogênio. KLKB1 é ativada pelo Fator XII e por contato com proteínas negativas do endotélio vascular, em locais de dano. A

principal fonte de KLKB1 sanguíneo é o fígado. (HAYAMA et al., 2016; LUNDWALL; BRATTSAND, 2008; NETH et al., 2001).

No sistema reprodutor masculino, KLKB1 é encontrada na próstata e nos testículos. Os testículos se destacam por ser o quarto órgão do corpo com a maior quantidade de transcritos pra KLKB1, com uma expressão correspondente a cerca de 10% da expressão hepática. A enzima está presente nas células de Leydig (citoplasma e núcleo) do interstício testicular e está ausente nos túbulos seminíferos. A produção de cininas nos testículos resulta em um aumento de fluxo sanguíneo e aumento do metabolismo das células de Sertoli, estimulando a espermatogênese. Na próstata, onde a expressão é de 2,5% da expressão hepática, a enzima está presente nas células epiteliais dos ácinos e dutos prostáticos, sendo a fonte das enzimas no sêmen. O papel de cininas no plasma seminal ainda não é bem entendido. (FINK et al., 2007; NETH et al., 2001; SCHILL; MISKA, 1992; SHIBAHARA et al., 2001; SIEMS et al., 2003; VEVERIS-LOWE et al., 2007).

Cininogênios de alto e baixo peso molecular estão presentes no trato reprodutor masculino e no plasma seminal. Cininases estão presentes na membrana das células de Sertoli, nas membranas de espermátides e espermatozoides, e também no plasma seminal, sendo provenientes da próstata (MONSEES; MISKA; SCHILL, 1996; SCHILL; MISKA, 1992; SHIBAHARA et al., 2001). Em amostras inférteis, cininases presentes na membrana citoplasmática dos espermatozoides estão com a atividade aumentada e há uma relação inversamente proporcional entre motilidade e atividade das cininases na membrana do espermatozoide. Incubação do sêmen com inibidores de cininases ou incubação com cininas resultam em aumento de motilidade. O mecanismo do aumento da motilidade não é conhecido, pois espermatozoides não apresentam receptores para cininas B1 e B2. (SHIBAHARA et al., 2001; SIEMS et al., 2003; VEVERIS-LOWE et al., 2007).

Em nosso estudo, a enzima KLKB1 apresentou atividade significativamente elevada nas amostras hiperviscosas, tanto férteis como inférteis. Uma vez que KLKB1 participa da indução inflamatória e é secretada pela próstata, o aumento de atividade em amostras hiperviscosas é mais um fator que sugere alteração da próstata do tipo inflamatória.

Adicionalmente, as análises mostraram que, ao se comparar os grupos férteis com os grupos inférteis, também houve um aumento significativo da atividade de KLKB1 nas amostras inférteis. Como o aumento de KLKB1 nas amostras normoviscosas inférteis não foi acompanhado de um aumento de KLKs teciduais, presume-se que esse aumento de atividade seja decorrente de problemas de origem testicular. Amostras inférteis caracterizam-se por menor concentração de espermatozoides no sêmen, indicando problemas na espermatogênese.



É possível que a alteração fisiológica testicular que está promovendo a redução da espermatogênese, também esteja causando aumento da atividade de KLKB1. Embora a expressão dessa enzima seja 4x maior nos testículos que na próstata, o único estudo que realizou imuno-histoquímica nos testículos, não detectou a presença de KLKB1 nos túbulos seminíferos, inferindo-se que não haja secreção da enzima em um testículo saudável. (FINK et al., 2007; NETH et al., 2001) Uma explicação que pode ser sugerida é que, em pacientes inférteis, danos testiculares estariam resultando no extravasamento dessas enzimas para a luz tubular, causando o aumento de atividade detectado no plasma seminal desses pacientes. Outra hipótese, é que a disfunção que está resultando na falha da espermatogênese está causando um aumento de fatores de ativação de KLKB1. Esses fatores seriam secretados no plasma seminal e ativariam KLKB1 secretadas pela próstata. Independente do mecanismo, aumento de KLKB1 parece indicar problema testicular. A possibilidade de haver uma atividade diferencial de KLKB1 entre testículo saudável e alterado poderia ser investigado, para a possibilidade de uso como biomarcador de disfunções testiculares.

KLKs teciduais e KLKB1 apresentaram maior atividade em amostras hiperviscosas, apontando para uma disfunção prostática nesses pacientes com sêmen hiperviscoso. Ainda, uma rota sugerida é que o aumento de atividade das KLKs teciduais na próstata está estimulando a secreção e atividade de metaloprotease de matriz (MMP). Tanto a KLKs teciduais, quanto as MMPs promovem degradação da matriz extracelular e devem estar alterando a fisiologia normal da glândula.

No sêmen, o aumento de atividade proteolítica pode estar resultando em hidrolises indesejadas das outras proteínas do plasma e de componentes moleculares de membrana nos espermatozoides, possivelmente prejudicando a qualidade desses gametas.

#### **6.4 Patologias da próstata**

As principais patologias que acometem a próstata são: neoplasia maligna de próstata, hiperplasia de próstata e prostatites. As neoplasias malignas e a hiperplasia de próstata estão associadas com o envelhecimento, acometendo homens com mais de 50 anos. Já as prostatites podem ocorrer em homens de todas as idades. (AUSMEES et al., 2013, 2014; SFANOS; MARZO, 2012) Em nosso estudo, pacientes com viscosidade aumentada apresentavam média de idade de 37 anos (25 e 56 anos), enquadrando esses pacientes estão casos de prostatite.

Prostatite consiste de inchaço da próstata decorrente de inflamação e pode ser dividida em quatro tipos: bacteriana aguda, bacteriana crônica, não bacteriana sintomática (síndrome da dor pélvica crônica, CPPS) e não bacteriana assintomática. As prostatites bacterianas representam cerca de 10% dos casos notificados, são causados principalmente pelos agentes *Escherichia coli* e *Enterococcus spp*, e são tratadas com administração de antibióticos. A CPPS representa 90% dos casos notificados, tem causa desconhecida e são de difícil tratamento. Já a prostatite não bacteriana assintomática tem prevalência desconhecida, já que não gera desconforto para o paciente procurar ajuda médica. Sua etiologia e seu impacto na fertilidade masculina também são desconhecidos e, quando descoberta, não é realizado tratamento. (AUSMEES et al., 2013, 2014; SFANOS; MARZO, 2012)

Elia et al encontrou que pacientes com sêmen hiperviscoso e com infecção bacteriana no trato reprodutor masculino (detectada por cultura seminal e biograma, resultado positivo  $> 10^5$  UFC/mL) tiveram os problemas de infecção e hiperviscosidade seminal solucionados com a administração de antibióticos e anti-inflamatórios. Entretanto, em pacientes que apresentavam hiperviscosidade sem infecção bacteriana, o tratamento foi insatisfatório. (ELIA et al., 2009) Esses achados indicam que infecção é um fator envolvido no quadro de hiperviscosidade seminal e que a normalização da fisiológica do trato restaura o parâmetro de viscosidade normal. Esse estudo também indica que alterações não infecciosas também estão envolvidas com a hiperviscosidade. No nosso estudo, foram identificadas que proteases de origem prostática apresentam maior atividades em sêmen hiperviscosos, indicando mudanças na fisiologia da próstata. Deste modo, sugerimos que alguns pacientes possam estar apresentando os quadros de prostatites bacterianas e outras prostatites não-bacterianas assintomáticas.

Para entender o quadro de inflamação que está ocorrendo no sistema reprodutor dos homens com hiperviscosidade seminal, mais estudos devem ser realizados. Uma estratégia seria analisar outros biomarcadores de inflamação no plasma seminal e caracterizar melhor as alterações que estão ocorrendo. Exemplos de marcadores de inflamação que podem ser analisados por ELISA são: fator de transcrição nuclear NF- $\kappa$ B, prostaglandinas, citocinas pró-inflamatórias (IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6, IL-8, IL-12, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ ) e citocinas anti-inflamatórias (IL-4, IL-5, IL-10, TGF- $\beta$ ). (BRENNER et al., 2014)

## 7 CONCLUSÃO

Nosso estudo encontrou que há um decréscimo significativo dos parâmetros seminais e do conteúdo mucoproteico total nas amostras hiperviscosas; assim como um aumento na atividade das enzimas proteolíticas nesses sêmens hiperviscosos. Esses resultados indicam que está ocorrendo uma disfunção das atividades fisiológicas no trato reprodutor masculino. Essas alterações no sistema reprodutor envolvem o aumento de atividade de metaloprotease, caliceínas teciduais e caliceínas plasmáticas que são secretadas pela próstata, sugerindo um processo inflamatório da glândula prostática nos pacientes com hiperviscosidade seminal. Além disso, como essas enzimas têm atividade proteolítica sobre proteínas de matriz extracelular, acreditamos que a hiperviscosidade seminal não seja decorrente da carência de liquefação do coágulo seminal. Adicionalmente, a atividade enzimática diferencial da caliceína plasmática deve ser investigada para uso como biomarcador de disfunção testicular.

## REFERÊNCIAS

- ACHARYA, M. M.; KATYARE, S. S. An improved micromethod for tyrosine estimation. **Zeitschrift fur Naturforschung - Section C Journal of Biosciences**, [s. l.], v. 59, n. 11–12, p. 897–900, 2004.
- AGARWAL, A. et al. Effect of Oxidative Stress on Male Reproduction. **The World Journal of Men's Health**, [s. l.], v. 32, n. 1, p. 1, 2014. Disponível em: <<https://synapse.koreamed.org/DOIx.php?id=10.5534/wjmh.2014.32.1.1>>
- ANDERSON, B. A. J.; MACLAGAN, N. F. The Isolation and Estimation of Urinary Mucoproteins. [s. l.], n. 1923, p. 638–644, 1954.
- ANDRADE-ROCHA, F. T. Physical analysis of ejaculate to evaluate the secretory activity of the seminal vesicles and prostate. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, [s. l.], v. 43, n. 11, p. 1203–1210, 2005.
- ANDROLOGY AUSTRALIA. Male Infertility, A Child for Our Own. **A Booklet in the series of consumer guides on Male Reproductive Health**, [s. l.], p. 17, 2014.
- APICHELA, S. A. et al. Llama oviductal sperm reservoirs: Involvement of bulbourethral glands. **Andrologia**, [s. l.], v. 46, n. 3, p. 290–295, 2014.
- AUSMEES, K. et al. Semen quality and associated reproductive indicators in middle-aged males: The role of non-malignant prostate conditions and genital tract inflammation. **World Journal of Urology**, [s. l.], v. 31, n. 6, p. 1411–1425, 2013.
- AUSMEES, K. et al. Semen quality in middle-aged males: Associations with prostate-specific antigen and age-related prostate conditions. **Human Fertility**, [s. l.], v. 17, n. 1, p. 60–66, 2014.
- AVENDAÑO, C. et al. Semen hyperviscosity treatment: n-acetil cysteine reduces viscosity and increases motile sperm recovery without detriment on sperm DNA integrity. **Fertility and Sterility**, [s. l.], v. 100, n. 3, p. S450–S451, 2013. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0015028213012879>>
- AYDEMIR, B. et al. The Influence of Oxidative Damage on Viscosity of Seminal Fluid in Infertile Men. **Journal of Andrology**, [s. l.], v. 29, n. 1, p. 41–46, 2008. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.2164/jandrol.107.003046>>
- BANGA, J. P. (KIng's C. S. of M. No Title **SDS-POLYACRYLAMIDE gel electrophoreses (SDS\_PAGE)**). [s.l: s.n.]. v. 3 Ed
- BAUMGART, E. et al. Quantitative differences in matrix metalloproteinase (MMP)-2, but not in MMP-9, tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)-1 or TIMP-2, in seminal plasma of normozoospermic and azoospermic patients. **Human Reproduction**, [s. l.], v. 17, n. 11, p. 2919–2923, 2002.
- BEHR, B. et al. Feasibility of sex-sorting sperm from the white and the black rhinoceros (*Ceratotherium simum*, *Diceros bicornis*). **Theriogenology**, [s. l.], v. 72, n. 3, p. 353–364, 2009.
- BOLTIN, D. et al. Mucin Function in Inflammatory Bowel Disease An Update. **J Clin Gastroenterol**, [s. l.], v. 47, n. 2, p. 106–111, 2013.
- BRAVO, P. W. et al. Degelification of alpaca semen and the effect of dilution rates on artificial insemination outcome. **Systems Biology in Reproductive Medicine**, [s. l.], v. 43, n.

3, p. 239–246, 1999.

BRAVO, P. W. et al. Semen preservation and artificial insemination in domesticated South American camelids. **Animal Reproduction Science**, [s. l.], v. 136, n. 3, p. 157–163, 2013.

BRAVO, P. W.; CCALLO, M.; GARNICA, J. The effect of enzymes on semen viscosity in Llamas and Alpacas. **Small Ruminant Research**, [s. l.], v. 38, n. 1, p. 91–95, 2000.

BRENNER, D. R. et al. **Cancer Epidemiol Biomarkers**. [s.l: s.n.]. v. 23

BROWN, P. D. et al. Expression of activated gelatinase in human invasive breast carcinoma. **Clinical & Experimental Metastasis**, [s. l.], v. 11, n. 2, p. 183–189, 1993.

CARPINO, A.; SICILIANO, L. Unaltered protein pattern/genital tract secretion marker levels in seminal plasma of highly viscous human ejaculates. **Archives of Andrology**, [s. l.], v. 41, n. 1, p. 31–35, 1998.

CARRETERO, M. I. et al. Evaluation of the effect of cooling and of the addition of collagenase on llama sperm DNA using toluidine blue. **Andrologia**, [s. l.], v. 44, n. SUPPL.1, p. 239–247, 2012.

CEJKO, B. I. et al. Substrate specificity of proteolytic activity in the testes fluid and seminal plasma of the common carp *Cyprinus carpio*. **Journal of Fish Biology**, [s. l.], v. 88, n. 5, p. 1904–1917, 2016.

CERA, E. Di. Serine Proteases. **International Union of Biochemistry and Molecular Biology Life**, [s. l.], v. 61, n. 5, p. 510–515, 2009.

CHARNEY, J.; TOMARELLI, R. A COLORIMETRIC METHOD FOR THE DETERMINATION OF THE PROTEOLYTIC ACTIVITY OF DUODENAL JUICE. **The Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], n. 171, p. 501–505, 1947.

CLAESON, G. et al. Designing of Peptide Substrates Different Approaches Exemplified by New Chromogenic Substrates for. [s. l.], v. 68, p. 62–68, 1978.

CLARKE, G. N. Liquefaction of viscous semen. **Fertility and sterility**, [s. l.], v. 37, n. 6, p. 855–856, 1982. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0015-0282\(16\)46353-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0015-0282(16)46353-3)>

COELHO, D. F. et al. Azocasein Substrate for Determination of Proteolytic Activity: Reexamining a Traditional Method Using Bromelain Samples. **BioMed Research International**, [s. l.], v. 2016, 2016.

COSTA-NETO, C. M. et al. Participation of kallikrein-kinin system in different pathologies. **International Immunopharmacology**, [s. l.], v. 8, n. 2, p. 135–142, 2008.

CUPPETT, V. A.; SIKKA, S. C.; NAZ, R. K. Presence of PSA antibodies in seminal plasma of infertile men. **Frontiers in Bioscience**, [s. l.], n. 9, p. 258–265, 2017.

DAW, C. et al. Semen hyperviscosity treatment and IUI outcome. **Fertility and Sterility**, [s. l.], v. 96, n. 3, p. S266–S267, 2011. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0015028211021169>>

DE LAMIRANDE, E. Semenogelin, the main protein of the human semen coagulum, regulates sperm function. **Seminars in Thrombosis and Hemostasis**, [s. l.], v. 33, n. 1, p. 60–68, 2007.

DIAMANDIS, E. P.; YOUSEF, G. M. Human tissue kallikrein gene family: a rich source of novel disease biomarkers. **Expert Rev.Mol.Diagn.**, [s. l.], v. 1, n. 2, p. 182–190,

2001.

DU PLESSIS, S. S.; GOKUL, S.; AGARWAL, A. Semen hyperviscosity: causes, consequences, and cures. **Frontiers in Bioscience**, [s. l.], n. 5, p. 224–231, 2013.

DUBK, J. Y.; GAUDREAU, D.; TREMBLAY, R. R. The Concentration of Immunoreactive Prostate Specific Antigen is not Decreased in Viscous Semen Samples Keine Konzentrationsverminderung des immunoreaktiven Prostata-spezifischen Antigens in viskosen Ejakulaten. [s. l.], v. 139, n. 2, p. 136–139, 1989.

ELIA, J. et al. Human semen hyperviscosity: prevalence, pathogenesis and therapeutic aspects. **Asian Journal of Andrology**, [s. l.], v. 11, n. 5, p. 609–615, 2009. Disponível em: <[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=19701219%5Cnhttp://www.asiaandro.com/Abstract.asp?doi=10.1038/aja.2009.46](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19701219%5Cnhttp://www.asiaandro.com/Abstract.asp?doi=10.1038/aja.2009.46)>

ELZANATY, S.; RICHTHOFF, J.; GIWERCMAN, A. Visco-elasticity of seminal fluid in relation to the epididymal and accessory sex gland function and its impact on sperm motility. **international journal of andrology**, [s. l.], n. 27, p. 94–100, 2004.

EMAMI, N. et al. Association between kallikrein-related peptidases (KLKs) and macroscopic indicators of semen analysis: Their relation to sperm motility. **Biological Chemistry**, [s. l.], v. 390, n. 9, p. 921–929, 2009.

ESFANDIARI, N. et al. Seminal hyperviscosity is associated with poor outcome of in vitro fertilization and embryo transfer: a prospective study. **Fertility and Sterility**, [s. l.], v. 90, n. 5, p. 1739–1743, 2008. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.fertnstert.2007.09.032>>

ESFANDIARI, N. et al. Seminal hyperviscosity is not associated with semenogelin degradation or sperm deoxyribonucleic acid damage: A prospective study of infertile couples. **Fertility and Sterility**, [s. l.], v. 101, n. 6, p. 1599–1603, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.fertnstert.2012.07.885>>

ESFANDIARI, N.; GOTLIEB, L.; CASPER, R. . Seminal hyperviscosity is associated with poor outcome of controlled ovarian stimulation and intrauterine insemination: a prospective study. **Int J Fertil Womens Med**, [s. l.], n. 51, p. 21–27, 2006.

FINK, E. et al. Cellular expression of plasma prekallikrein in human tissues. **Biological Chemistry**, [s. l.], v. 388, n. 9, p. 957–963, 2007.

FLINT, M.; DU PLESSIS, S. S.; MENKVELD, R. Revisiting the assessment of semen viscosity and its relationship to leucocytospermia. **Andrologia**, [s. l.], v. 46, n. 8, p. 837–841, 2014.

FOLIN, O.; CIOCALTEAU, V. Tyrosine and Tryptophane in Proteins. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 73, n. 2, p. 627–648, 1927.

FOURNIER, T.; MEDJOUBI, N.; PORQUET, D. Alpha-1-acid glycoprotein 1. **Biochim.Biophys.Acta**, [s. l.], v. 1482, n. 0006–3002 (Print), p. 157–171, 2000.

FRENETTE, G.; TREMBLAY, R. R.; DUBÉ, J. Y. Zinc binding to major human seminal coagulum proteins. **Systems Biology in Reproductive Medicine**, [s. l.], v. 23, n. 2, p. 155–163, 1989.

FUJII, J.; IMAI, H. Redox reactions in mammalian spermatogenesis and the potential targets of reactive oxygen species under oxidative stress. **Spermatogenesis**, [s. l.], v. 4, n. 2, p. e979108, 2014. Disponível em:

<<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.4161/21565562.2014.979108>>

FUNG, K. Y. C. et al. A comprehensive characterization of the peptide and protein constituents of human seminal fluid. **The Prostate**, [s. l.], v. 61, n. 2, p. 171–181, 2004. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/pros.20089>>

GAO, L. et al. Tissue kallikrein promotes prostate cancer cell migration and invasion via a protease-activated receptor-1-dependent signaling pathway. **Biological chemistry**, [s. l.], v. 391, n. 7, p. 803–812, 2010.

GIULIANO, S. et al. Improvement of llama (*Lama glama*) seminal characteristics using collagenase. **Animal Reproduction Science**, [s. l.], v. 118, n. 1, p. 98–102, 2010.

GONZALES, G. F.; KORTEBANI, G.; MAZZOLLI, A. B. HYPERVISCOSITY AND HYPOFUNCTION OF THE SEMINAL VESICLES Semen Quality in Relation to Viscosity of Semen. [s. l.], v. 68, p. 63–68, 1993.

GOPALKRISHNAN, K.; PADWAL, V.; BALAIAH, D. Does seminal fluid viscosity influence sperm chromatin integrity? **Systems Biology in Reproductive Medicine**, [s. l.], v. 45, n. 2, p. 99–103, 2000.

HADLER-OLSEN, E.; WINBERG, J. O.; UHLIN-HANSEN, L. Matrix metalloproteinases in cancer: Their value as diagnostic and prognostic markers and therapeutic targets. **Tumor Biology**, [s. l.], v. 34, n. 4, p. 2041–2051, 2013.

HAYAMA, T. et al. Kallikrein Promotes Inflammation in Human Dental Pulp Cells Via Protease-Activated Receptor-1. **Journal of Cellular Biochemistry**, [s. l.], v. 117, n. 7, p. 1522–1528, 2016.

HEDSTROM, L. Serine protease mechanism and specificity. **Chemical Reviews**, [s. l.], v. 102, n. 12, p. 4501–4523, 2002.

HERWIG, R. et al. Proteomic analysis of seminal plasma from infertile patients with oligoasthenoteratozoospermia due to oxidative stress and comparison with fertile volunteers. **Fertility and Sterility**, [s. l.], v. 100, n. 2, p. 355–366.e2, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.fertnstert.2013.03.048>>

HEUSSEN, C.; DOWDLE, E. B. Electrophoretic analysis of plasminogen activators in polyacrylamide gels containing sodium dodecyl sulfate and copolymerized substrates. **Analytical Biochemistry**, [s. l.], v. 102, n. 1, p. 196–202, 1980.

HIBBS, M. S. et al. Biochemical and immunological characterization of the secreted forms of human neutrophil gelatinase. **The Journal of biological chemistry**, [s. l.], v. 260, n. 4, p. 2493–500, 1985.

INTASQUI, P. et al. Differences in the seminal plasma proteome are associated with oxidative stress levels in men with normal semen parameters. **Fertility and Sterility**, [s. l.], v. 104, n. 2, p. 292–301, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.fertnstert.2015.04.037>>

JOHANSSON, M. E. V.; SJÖVALL, H.; HANSSON, G. C. The gastrointestinal mucus system in health and disease. **Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology**, [s. l.], v. 10, n. 6, p. 352–361, 2013.

JUYENA, N. S.; STELLETTA, C. Seminal plasma: An essential attribute to spermatozoa. **Journal of Andrology**, [s. l.], v. 33, n. 4, p. 536–551, 2012.

KALINSKA, M. et al. Kallikreins - the melting pot of activity and function. **Biochimie**, [s. l.], n. 122, p. 1-21270–282, 2016.

KERSHAW-YOUNG, C. M.; EVANS, G.; MAXWELL, W. M. C. Glycosaminoglycans in the accessory sex glands, testes and seminal plasma of alpaca and ram. **Reproduction, Fertility and Development**, [s. l.], v. 24, n. 2, p. 362–369, 2012.

KERSHAW-YOUNG, C. M.; MAXWELL, W. Seminal plasma components in camelids and comparisons with other species. **Reproduction in Domestic Animals**, [s. l.], v. 47, n. SUPPL.4, p. 369–375, 2012.

KIM, Y. S.; HO, S. B. Intestinal goblet cells and mucins in health and disease: Recent insights and progress. **Current Gastroenterology Reports**, [s. l.], v. 12, n. 5, p. 319–330, 2010.

KUSSLER, A. P. S. et al. Mechanical processing of hyperviscous semen specimens can negatively affect sperm DNA fragmentation. **International Urology and Nephrology**, [s. l.], v. 46, n. 4, p. 737–742, 2014.

LA VIGNERA, S. et al. Hyperviscosity of semen in patients with male accessory gland infection: Direct measurement with quantitative viscosimeter. **Andrologia**, [s. l.], v. 44, n. SUPPL.1, p. 556–559, 2012.

LAYALI, I. et al. Total antioxidant capacity and lipid peroxidation in semen of patient with hyperviscosity. **Cell Journal**, [s. l.], v. 16, n. 4, p. 554–559, 2015.

LEBER, T. M.; BALKWILL, F. R. Zymography: A single-step staining method for quantitation of proteolytic activity on substrate gels. **Analytical Biochemistry**, [s. l.], v. 249, n. 1, p. 24–28, 1997.

LOKANT, M. T.; NAZ, R. K. Presence of PSA auto-antibodies in men with prostate abnormalities (prostate cancer/benign prostatic hyperplasia/prostatitis). **Andrologia**, [s. l.], v. 47, n. 3, p. 328–332, 2015.

LUNDWALL, Å.; BRATTSAND, M. Kallikrein-related peptidases. **Cellular and Molecular Life Sciences**, [s. l.], v. 65, n. 13, p. 2019–2038, 2008.

LUO, Z. et al. Orosomucoid, an acute response protein with multiple modulating activities. **Journal of Physiology and Biochemistry**, [s. l.], v. 71, n. 2, p. 329–340, 2015.

MADALA, P. K. et al. Update 1 of: Proteases universally recognize beta strands in their active sites. **Chemical Reviews**, [s. l.], v. 110, n. 6, p. PR1-PR31, 2010.

MAO, S. et al. Evaluation of the effectiveness of semen storage and sperm purification methods for spermatozoa transcript profiling. **Systems Biology in Reproductive Medicine**, [s. l.], v. 59, n. 5, p. 287–295, 2013.

MARGOLIS, J.; KENRICK, K. G. Polyacrylamide gel-electrophoresis across a molecular sieve gradient [18]. **Nature**, [s. l.], v. 214, n. 5095, p. 1334–1336, 1967.

MENDELUK, G. S E M E N C U L T U R E , L E U K O C Y T O s P E R M I a , a N D T H E P R E S E N C E O F S P E R M a N T I b O D I e S i n S E M i n a L H Y P E R V I s C O S I t Y. [s. l.], v. 28, p. 21–28, 1999.

MENDELUK, G. et al. Factors involved in the biochemical etiology of human seminal plasma hyperviscosity. **Journal of andrology**, [s. l.], v. 21, n. 2, p. 262–267, 2000.

MÉTAYER, S. et al. Comparison, characterization, and identification of proteases and protease inhibitors in epididymal fluids of domestic mammals. Matrix metalloproteinases are major fluid gelatinases. **Biology of reproduction**, [s. l.], v. 66, p. 1219–1229, 2002.

MONSEES, T. K.; MISKA, W.; SCHILL, W. B. Characterization of kininases in



testicular cells. **Immunopharmacology**, [s. l.], v. 32, n. 1–3, p. 169–171, 1996.

MORTON, K. M. et al. Quality parameters for alpaca (*Vicugna pacos*) semen are affected by semen collection procedure. **Reproduction in Domestic Animals**, [s. l.], v. 45, n. 4, p. 637–643, 2010.

MOSCOSO, R. Ejaculatory Proces S and Related S Emen Characteris Tics. [s. l.], v. 72, p. 65–72, 2002.

NEITZEL, B. J. J. et al. Enzyme Catalysis : The Serine Proteases. [s. l.], v. 3, n. 2010, p. 1–7, 2010.

NETH, P. et al. The mRNAs of prekallikrein, factors XI and XII, and kininogen, components of the contact phase cascade are differentially expressed in multiple non-hepatic human tissues. **Thrombosis and Haemostasis**, [s. l.], v. 85, n. 6, p. 1043–1047, 2001.

PFEIFER, S. et al. Diagnostic evaluation of the infertile male: A committee opinion. **Fertility and Sterility**, [s. l.], v. 103, n. 3, p. e18–e25, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.fertnstert.2014.12.103>>

ROSSI, T. et al. High frequency of (TG)mTn variant tracts in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene in men with high semen viscosity. **Fertil.Steril.**, [s. l.], v. 82, n. 5, p. 1316–1322, 2004.

RUSSO, C. L. et al. Mucin gene expression in human male urogenital tract epithelia. **Human Reproduction**, [s. l.], v. 21, n. 11, p. 2783–2793, 2006. Disponível em: <<https://academic.oup.com/humrep/article-lookup/doi/10.1093/humrep/del164>>

SCHILL, W. -B; MISKA, W. Possible effects of the kallikrein-kinin system on male reproductive functions. **Andrologia**, [s. l.], v. 24, n. 2, p. 69–75, 1992.

SFANOS, K.; MARZO, A. Prostate Cancer and Inflammation. **Histopathology**, [s. l.], v. 60, n. 11, p. 199–215, 2012.

SHARMA, R. et al. Proteomic analysis of seminal fluid from men exhibiting oxidative stress. **Reproductive Biology and Endocrinology**, [s. l.], v. 11, n. 1, p. 85, 2013. Disponível em: <<http://rbej.biomedcentral.com/articles/10.1186/1477-7827-11-85>>

SHIBAHARA, H. et al. Activity of testis angiotensin converting enzyme (ACE) in ejaculated human spermatozoa. **International Journal of Andrology**, [s. l.], v. 24, n. 5, p. 295–299, 2001.

SHIMOKAWA KI, K. et al. Matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 activities in human seminal plasma. **Molecular human reproduction**, [s. l.], v. 8, n. 1, p. 32–6, 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11756567>>

SICILIANO, L. et al. Impaired seminal antioxidant capacity in human semen with hyperviscosity or oligoasthenozoospermia. **Journal of andrology**, [s. l.], v. 22, n. 5, p. 798–803, 2001.

SIEMS, W. E. et al. Effects of kinins on mammalian spermatozoa and the impact of peptidolytic enzymes. **Andrologia**, [s. l.], v. 35, n. 1, p. 44–54, 2003.

SMITH, P. K. et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. **Analytical Biochemistry**, [s. l.], v. 150, n. 1, p. 76–85, 1985.

SOBIESZEK, A. Gradient polyacrylamide gel electrophoresis in presence of sodium dodecyl sulfate: A practical approach to muscle contractile and regulatory proteins. **Electrophoresis**, [s. l.], v. 15, n. 1, p. 1014–1020, 1994.

SOTIROPOULOU, G.; PAMPALAKIS, G. Kallikrein-related peptidases: Bridges between immune functions and extracellular matrix degradation. **Biological Chemistry**, [s. l.], v. 391, n. 4, p. 321–331, 2010.

SUZUKI, K. et al. The Interaction among Protein C Inhibitor , Prostate-Specific Antigen , and the Semenogelin System. **Seminars In Thrombosis And Hemostasis**, [s. l.], v. 33, n. 1, p. 46–52, 2007.

TECLES, F.; MARTÍNEZ-SUBIELA, S.; CERÓN, J. J. Optimization of a spectrophotometric method for quantification of acid-soluble glycoprotein in porcine serum. **Canadian Journal of Veterinary Research**, [s. l.], v. 71, n. 3, p. 161–164, 2007.

TENTES, I. et al. Matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 in seminal plasma. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, [s. l.], v. 24, n. 7, p. 278–281, 2007.

THURSTON, R. J. et al. Proteolytic enzymes in seminal plasma of domestic turkey (*Meleagris gallopavo*). **Biol Reprod**, [s. l.], v. 48, n. 2, p. 393–402, 1993. Disponível em: <7679933>

VANDOOREN, J. et al. Zymography methods for visualizing hydrolytic enzymes. **Nature Methods**, [s. l.], v. 10, n. 3, p. 211–220, 2013.

VEVERIS-LOWE, T. L. et al. Seminal fluid characterization for male fertility and prostate cancer: Kallikrein-related serine proteases and whole proteome approaches. **Seminars in Thrombosis and Hemostasis**, [s. l.], v. 33, n. 1, p. 87–99, 2007.

VICKRAM, A. S. et al. Validation of artificial neural network models for predicting biochemical markers associated with male infertility. **Systems Biology in Reproductive Medicine**, [s. l.], v. 62, n. 4, p. 258–265, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1080/19396368.2016.1185654>>

WANG, S. et al. Proteomic characteristics of human sperm cryopreservation. **Proteomics**, [s. l.], v. 14, n. 2–3, p. 298–310, 2014.

WILSON, M. J. et al. Gelatinolytic And Caseinolytic Proteinase Activities In Human Prostatic Secretions. **The Journal of Urology**, [s. l.], v. 149, n. 3, p. 653–658, 1993. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022534717361736>>

WINZLER, R. J. Determination of serum glycoproteins. **Meth Biochem Anal**, [s. l.], v. 2, n. 206, p. 279–307, 1955.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Examination and processing of human semen. **WHO laboratory manual**, [s. l.], v. 5th Editio, 2010.

YIN, H. et al. Gelatinolytic proteinase activities in human seminal plasma. [s. l.], n. 81, p. 491–501, 1990.

YOSHIDA, K. et al. Physiological roles of semenogelin I and zinc in sperm motility and semen coagulation on ejaculation in humans. **Molecular Human Reproduction**, [s. l.], v. 14, n. 3, p. 151–156, 2008.

## **TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)**

Título da Pesquisa: Perfil proteico, mucina 5B no fluido seminal e expressão do gene glutationa peroxidase 4 em espermatozoides de pacientes com sêmen hiperviscoso

Você está sendo convidado a participar de uma pesquisa acadêmica realizada pelo Serviço de Urologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) e Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) que tem por objetivo conhecer quais são as funções de algumas proteínas que compõem o sêmen humano. O tema tem como propósito entender que alterações nas proteínas do sêmen podem prejudicar a fertilidade masculina.

Esta pesquisa está sendo desenvolvida pelo Dr. Charles Teilor Rodrigues (Biomédico / Habilitação em Reprodução Humana / Pesquisador acadêmico do HCPA e UFRGS), sob a supervisão e orientação do Dr. Edison Capp (Médico Ginecologista / Especialização em Reprodução Humana / Professor do HCPA e UFRGS).

Se você aceitar, sua participação implicará em autorizar os pesquisadores a consultar os resultados do exame de Espermograma que você realizará para fins assistenciais. Gostaríamos também de solicitar sua autorização para utilizar o sêmen após a realização do Espermograma. Normalmente o sêmen é descartado depois da realização do exame, mas, se você autorizar, utilizaremos o sêmen para analisar a composição (proteínas), que é o objetivo dessa pesquisa.

Sua participação não vai gerar resultados diretos para você, mas você estará contribuindo para que possamos compreender quais proteínas causam mudanças na viscosidade do sêmen e entender como essas mudanças afetam a fertilidade masculina.

Não são conhecidos riscos pela sua participação na pesquisa e sua participação não vai interferir nos resultados do exame do Espermograma. Um possível desconforto pode ser o constrangimento de realizar a coleta de sêmen; entretanto, esse ato faz parte do procedimento do Espermograma solicitado. Os pesquisadores estão habituados com a rotina de receber amostras biológicas para estudo, não havendo necessidade de constrangimento.

Sua participação na pesquisa não é obrigatória. Caso você decida não participar ou caso você inicialmente aceite participar e depois mude de ideia e desista de participar, isso não causará nenhum prejuízo no atendimento que você recebe ou receberá nesta instituição.

Não está previsto nenhum tipo de pagamento pela sua participação na pesquisa e você também não terá nenhum custo com respeito aos procedimentos envolvidos na pesquisa. Se por acaso ocorrer alguma intercorrência decorrente de sua participação na pesquisa, você receberá todo o atendimento necessário, sem nenhum custo pessoal

Os dados coletados serão utilizados apenas para esta pesquisa, serão sempre tratados de forma confidencial e após o desenvolvimento da pesquisa os dados serão totalmente apagados num prazo de um ano, conforme preconiza a Resolução 466/12. Os resultados desta pesquisa serão apresentados sem a identificação dos participantes, assim, seu nome não aparecerá na publicação dos resultados.

Você tem garantia de receber resposta a qualquer pergunta, dúvida, informação e de receber esclarecimento acerca dos assuntos relacionados a esta pesquisa.

Caso você tenha dúvidas ou queira ter informações sobre a pesquisa, poderá entrar em contato a qualquer momento com os pesquisadores Dr. Edison Capp e Dr. Charles Teilor Rodrigues, pelo telefone (51) 3308-3559, e-mail: edcapp@ufrgs.br, endereço Rua Sarmento Leite 500, 2º andar do Instituto de Ciências Básicas da Saúde, sala 228, de segunda à sexta, das 9h às 17h; ou entrar em contato com Daniel Demétrio Faustino da Silva, Coordenador-geral do Comitê de Ética em Pesquisa do GHC pelo telefone 3357-2407, endereço Av. Francisco Trein 596, 3º andar, Bloco H, sala 11, das 09h às 12h e das 14h:30min às 17h.

Esse Termo é assinado em duas vias, sendo uma para o participante e outra para os pesquisadores.

Eu, \_\_\_\_\_ (nome do paciente), recebi as informações sobre os objetivos e a importância desta pesquisa de forma clara e concordo em participar do estudo. \_\_\_\_\_ (Assinatura).

---

(Nome do pesquisador que aplicou o Termo / Assinatura)

Porto Alegre, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_.