

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**

**EFEITO DO DESBALANÇO GENÉTICO E
FARMACOLÓGICO DO METABOLISMO OXIDATIVO EM
INDICADORES DE FERTILIDADE MASCULINA**

TESE DE DOUTORADO

Felipe Costa

Santa Maria, RS, Brasil

2016

**EFEITO DO DESBALANÇO GENÉTICO E
FARMACOLÓGICO DO METABOLISMO OXIDATIVO EM
INDICADORES DE FERTILIDADE MASCULINA**

por

Felipe Costa

Tese de Doutorado apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Área de Concentração em Farmacologia dos Processos Oxidativos, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM,RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Farmacologia**

Orientadora: Prof^a.Dr^a. Ivana Beatrice Mânica da Cruz

Santa Maria, RS, Brasil

2016

Ficha catalográfica



Ficha catalográfica elaborada por
Biblioteca Central da UFSM

© 2016

Todos os direitos autorais reservados a Felipe Costa. A reprodução de partes ou do todo deste trabalho só poderá ser feita mediante a citação da fonte.

Endereço: Rua Doze, n. 2010, Bairro da Luz, Santa Maria, RS. CEP:97110-680

Fone: (055)5532225678; Fax: (055)5532251144; E-mail: ufsme@ct.ufsm.br

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia**

**A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
Aprova a Tese de Doutorado**

**EFEITO DO DESBALANÇO GENÉTICO E
FARMACOLÓGICO DO METABOLISMO OXIDATIVO EM
INDICADORES DE FERTILIDADE MASCULINA**

elaborada por
Felipe Costa

como requisito parcial para obtenção do grau de
Doutor em Farmacologia

COMISSÃO EXAMINADORA

Ivana Beatrice Mânica da Cruz, Dr^a,
(Presidente/Orientadora)

Roselei Fachinetto, Dr^a (UFSM)

Guilherme Bresciani, Dr. (PUCV)

Fabio Vasconcellos Comim, Dr. (UFSM)

Michele Rorato Sagrillo, Dr^a (Unifra)

Santa Maria, 07 de dezembro de 2016

AGRADECIMENTOS

A minha incansável orientadora, a professora Dr^a Ivana Beatrice Mânica da Cruz, que confiou em mim, e me oportunizou um novo caminho, do saber científico, da qual é expert, com total dedicação e brilhantismo.

Aos colegas do Laboratório de Biogenômica Fernanda, Charles, Arae, Nicolle, Andressa e Felipe que foram muito importantes no dia a dia, que colaboraram na parte experimental deste trabalho e pela convivência que foi muito prazerosa e enriquecedora.

Ao Curso de Medicina da Universidade de Santa Cruz do Sul (UNISC) pelo apoio e incentivo nessa etapa acadêmica e a todos os colegas professores e funcionários do Departamento de Biologia e Farmácia da UNISC.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal de Santa Maria, pelos ensinamentos e apoio para a realização deste trabalho.

Ao CNPq e FAPERGS pelos auxílios a pesquisa.

Aos meus pais, Madril e Anita, pelo estímulo constante e conforto incondicional. Amo v

RESUMO

Tese de Doutorado

Programa de Pós-Graduação em Farmacologia

Universidade Federal de Santa Maria

EFEITO DO DESBALANÇO GENÉTICO E FARMACOLÓGICO DO METABOLISMO OXIDATIVO EM INDICADORES DE FERTILIDADE MASCULINA

AUTOR: Felipe Costa

ORIENTADORA: Prof^a Dr^a Ivana Beatrice Mânica da Cruz

Data e Local da Apresentação: Santa Maria, 07 de dezembro de 2016

Estudos prévios indicam que alterações no metabolismo oxidativo podem atuar no sucesso reprodutivo. A enzima superóxido dismutase dependente de manganês (SOD2), chave no equilíbrio oxidativo, apresenta uma variação genética Val16Ala-SOD2 que leva a uma mudança na sua eficiência causando um desequilíbrio entre os níveis de superóxido (S) e peróxido de hidrogênio (HP) das células. Estudos sugeriram que os ambos genótipos homozigóticos (AA-VV) causam um desbalanço S – HP associado ao risco de diversas doenças crônicas, além de interferir no sucesso reprodutivo feminino. Assim, o objetivo desse trabalho foi investigar o efeito do desbalanço genético causado pelo polimorfismo Val16Ala-SOD2 e farmacológico induzido pelo tratamento com paraquat no metabolismo oxidativo e em indicadores de fertilidade masculina. Para a análise *in vitro* do impacto do desbalanço S- HP causado por ação farmacológica do paraquat, foi conduzida a validação de um método de quantificação dos níveis de cfDNA no plasma seminal através de fluorimetria utilizando o corante DNA Picogreen®. O segundo protocolo investigou a associação entre o polimorfismo Val16Ala-SOD2 com alterações nos parâmetros de fertilidade masculina determinados pela OMS, através da avaliação da associação deste polimorfismo com níveis elevados de cfDNA e de marcadores de estresse oxidativo no plasma seminal. Amostras de sêmen foram obtidas de voluntários saudáveis ou de amostras excedentes utilizadas para a realização de espermograma em laboratório de análises clínicas, as amostras foram processadas e analisadas no Laboratório Biogenômica, através de testes espectrofotométricos e moleculares. O conjunto dos resultados demonstrou associação significativa entre níveis elevados de cfDNA e parâmetros alterados de fertilidade no sêmen, como : baixa viabilidade, alterações na motilidade e morfologia espermática. Análise *in vitro* complementar confirmou que elevados níveis de S causam estresse oxidativo e diminuem a viabilidade espermática. O conjunto destes resultados corroborou a hipótese de que os níveis de cfDNA poderiam ser marcadores da qualidade espermática geral e estresse oxidativo.

Palavras Chave: infertilidade, polimorfismo Val16Ala SOD2, qualidade espermática, estresse oxidativo.

ABSTRACT

Doctor Degree Thesis
Post-Graduate Program in Pharmacology
Federal University of Santa Maria

EFFECT OF GENETIC AND PHARMACOLOGICAL DISBURSEMENT OF OXIDATIVE METABOLISM IN MALE FERTILITY INDICATOR

AUTHOR: Felipe Costa

ADVISOR: Prof^a Dr^a Ivana Beatrice Mânica da Cruz

Date and place of the defense: Santa Maria, 07th december, 2016.

Previous studies indicate that changes in oxidative metabolism may play a role in reproductive success. Manganese-dependent superoxide dismutase enzyme (SOD2), a key in the oxidative balance, presents a genetic variation Val16Ala-SOD2 that leads to a change in its efficiency causing an imbalance between the superoxide (S) and hydrogen peroxide (HP) levels of Cells. Studies have suggested that both homozygous genotypes (AA-VV) cause an S-HP imbalance associated with the risk of various chronic diseases, and interfere with female reproductive success. Thus, the objective of this work was to investigate the effect of the genetic imbalance caused by the polymorphism Val16Ala-SOD2 and pharmacological induced by the treatment with paraquat in oxidative metabolism and in male fertility indicators. For the in vitro analysis of the impact of the S-HP imbalance caused by the pharmacological action of paraquat, a method of quantification of the levels of cfDNA in the seminal plasma was conducted by fluorimetry using the DNA Picogreen. The second protocol investigated the association between the Val16Ala-SOD2 polymorphism with changes in the male fertility parameters determined by the WHO, by evaluating the association of this polymorphism with high levels of cfDNA and markers of oxidative stress in seminal plasma. Semen samples were obtained from healthy volunteers or from surplus samples used to perform sperm in laboratory clinical analyzes, the samples were processed and analyzed in the Biogenomic Laboratory, through spectrophotometric and molecular tests. The results showed a significant association between elevated levels of cfDNA and altered fertility parameters in semen, such as: low viability, changes in motility and sperm morphology. In vitro complementary analysis confirmed that high levels of S causes oxidative stress and decrease sperm viability. These results corroborated the hypothesis that cfDNA levels could be markers of general sperm quality and oxidative stress.

Key words: Infertility, Val16Ala-SOD2 polymorphism, sperm quality, oxidative stress.

SUMÁRIO

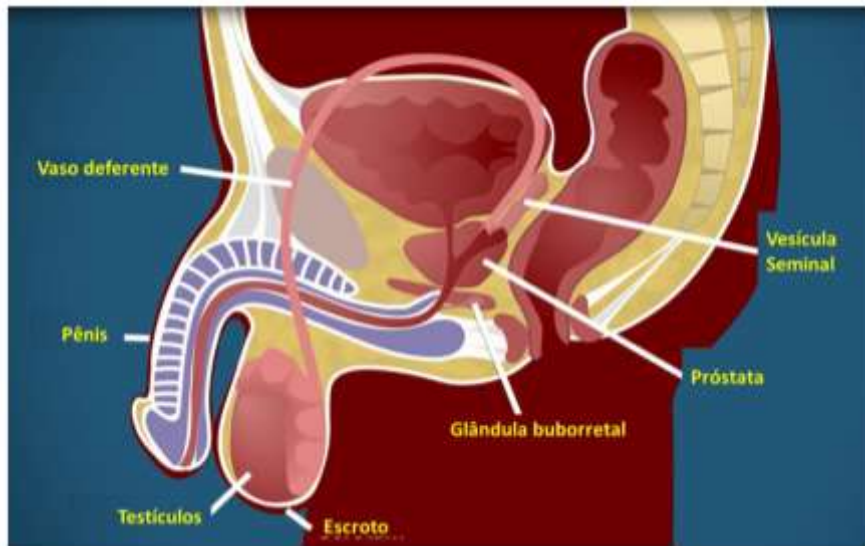
1-INTRODUÇÃO	10
1.1 SISTEMA REPRODUTIVO MASCULINO: ANATOMO-FISIOLOGIA	10
1.2 INFERTILIDADE E MEDICINA REPRODUTIVA.....	14
1.3 ESTRESSE OXIDATIVO E FERTILIDADE MASCULINA	17
1.3.1 Apoptose em espermatozoides	18
1.3.1 Sistema de defesa Antioxidante Endógeno	20
1.4 POLIMORFISMO VAL16ALA DA SUPERÓXIDO DISMUTASE 2	21
1.5 POLIMORFISMO VAL16ALA-SOD2 E BIOLOGIA REPRODUTIVA.....	25
1.6 METIL VIOLOGÊNIO (PARAQUAT)	26
1.7 HIPÓTESE DO ESTUDO	27
2-OBJETIVOS	28
2.1 OBJETIVO GERAL	28
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	28
3- RESULTADOS.....	29
3.1 MANUSCRITO 1	29
3.2 MANUSCRITO 2	48
4- DISCUSSÃO.....	68
5- CONCLUSÃO	74
REFERÊNCIAS	75
ANEXO 1- COMPROVANTE DE ACEITE DO MANUSCRITO	82
ANEXO 2- COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DO MANUSCRITO 2.....	83

1-INTRODUÇÃO

1.1 SISTEMA REPRODUTIVO MASCULINO: ANATOMO-FISIOLOGIA

O sistema reprodutivo masculino é caracterizado por um conjunto de túbulos com padrões histofisiológicos diferenciados que possuem distintas funções e glândulas. A genitália externa é formada pelo pênis, escroto, que contém os testículos. A parte interna é formada pelo epidídimo, vaso deferente, vaso eferente, glândulas bulboretais, vesículas seminais, próstata e uretra peniana (Figura 1) (SADLER et al., 2016; BIONLINE 2016). Na figura 1, abaixo, estão representadas as principais estruturas do sistema reprodutor masculino.

Figura 1: Principais estruturas do sistema reprodutor masculino



Fonte: Bionline-UFSM (2016)

O pênis é um órgão erétil e copulador masculino e pode ser subdividido em raiz, corpo e glândula. Em termos histológicos este órgão é constituído basicamente por três camadas de tecido muscular, e uretra, envoltas externamente pela pele. Duas destas três camadas estão dispostas dorsalmente formando os corpos cavernosos do pênis, que ficam na parte superior do órgão. A outra, camada é ventral (inferior do pênis), sendo chamada de corpo cavernoso da uretra e envolve a uretra peniana em todo o seu trajeto. Na sua porção terminal, os corpos cavernosos

terminam por trás de uma expansão do corpo esponjoso, denominada glândula (MOORE et al., 2013).

Os três corpos cavernosos encontram-se envoltos por uma resistente membrana de tecido conjuntivo denso (túnica albugínea) no interior do pênis. Essa membrana forma um septo que penetra os dois corpos cavernosos do mesmo. Os corpos cavernosos do pênis e da uretra são formados por um emaranhado de vasos sanguíneos dilatados, revestidos por endotélio. Na região externa, entre a glândula e o corpo do pênis, existe o prepúcio que é uma prega retrátil da pele composta de tecido conjuntivo e músculo liso (MOORE et al., 2013).

A outra estrutura anatômica externa do sistema reprodutivo é o escroto. O escroto é uma bolsa formada por músculos e pele onde estão contidos os testículos, o epidídimo e os ductos deferentes. A túnica albugínea envolve os testículos que são constituídos por túbulos enovelados e túbulos seminíferos, na parede dos quais são produzidos os espermatozoides, originários das células germinativas primárias (espermatogênese) e da diferenciação das espermatídes (espermioogênese). Os túbulos seminíferos nos testículos estão associados às células intersticiais de Leydig, as quais secretam os hormônios masculinos como a testosterona para a circulação e são sustentados e nutridos por células especiais conhecidas como células de Sertoli. Projeções citoplasmáticas destas células é que formam a barreira hemato-testicular via junções de oclusão. (MOORE et al., 2013; SADLER et al., 2016) .

As duas extremidades de cada túbulo seminífero se direcionam inicialmente para uma rede de vasos que, por sua vez desembocam em um único túbulo altamente enovelado denominado epidídimo. O canal deferente que se liga ao epidídimo é o túbulo que conecta as estruturas contidas no escroto com o interior da cavidade abdominal masculina ligando-se ao ducto ejaculador e uretra prostática que se comunica com o exterior. Os espermatozoides desde a sua produção até o seu amadurecimento e ejaculação precisam percorrer cada uma dessas estruturas anatômicas que possuem papéis funcionais específicos (MOORE et al., 2013; SADLER et al., 2016) .

Quando os espermatozoides são produzidos pelos túbulos seminíferos eles ainda não têm motilidade e capacidade de fecundação (são imaturos). Para se tornarem aptos a reprodução eles deverão sofrer uma série de alterações fisiológicas no interior do epidídimo. O epidídimo é composto por cabeça, corpo e cauda. O corpo é constituído por um canal único, longo (quatro a seis metros) e intensamente enovelado sobre si mesmo, na cauda vai se tornando retilíneo

convertendo-se no vaso deferente. O epidídimo é revestido internamente por células epiteliais arredondadas e prismáticas, que estão apoiadas em uma membrana basal envolvida por fibras musculares lisas e um tecido conjuntivo frouxo, ricamente vascularizado (SADLER et al., 2016).

Os espermatozoides transitam ao longo do epidídimo durante 1 a 2 semanas até se tornarem maduros. Inicialmente o líquido que envolve os espermatozoides produzidos pelos túbulos seminíferos são reabsorvidos através de canais existentes na cabeça dos espermatozoides denominados aquaporinas. Este processo aumenta a concentração dos espermatozoides no interior do epidídimo que produz um líquido que circunda os gametas e os empurra em direção ao corpo do epidídimo e posteriormente a região cauda. Ao longo desse transporte ocorrem mudanças na composição de proteínas da membrana dos espermatozoides, o que os torna móveis. No caso, a motilidade está diretamente relacionada com níveis maiores e controlados de bicarbonato no interior do epidídimo. Também ocorre aumento nos níveis de cálcio ao longo do epidídimo (DACHEUX E DACHEUX, 2014; SADLER et al., 2016).

O epidídimo também sintetiza proteínas que agem no amadurecimento dos espermatozoides, 20 tipos representam de 80 a 90% das proteínas que se encontram no epidídimo como a lactoferrina, lipocaína, clusterina que está em maior concentração e a prostaglandina. Além disto, este meio químico faz com que os espermatozoides adquiram a capacidade de se ligarem a zona pelúcida do ócito via redistribuição de proteínas já presentes na membrana espermática como a ADAMS, CRISP e IZUMO. No caso, a proteína ADAMS é fundamental para o sucesso da fecundação pelo espermatozoide. Uma vez amadurecidos os espermatozoides ficam armazenados na cauda do epidídimo onde podem permanecer até 30 dias antes de serem ejaculados (DACHEUX E DACHEUX, 2014; SADLER et al., 2016).

No momento da ejaculação os espermatozoides são transportados para o interior da cavidade abdominal e passam a ser banhados por uma secreção produzida pelas vesículas seminais. As vesículas seminais são duas bolsas membranosas lobuladas, localizadas entre o fundo da bexiga e o reto, obliquamente acima da próstata. As vesículas seminais secretam cerca de 70% do volume ejaculado (sêmen), um líquido alcalino que ajuda a amenizar o pH ácido da uretra do homem e do canal vaginal, sem esta neutralização do meio, os espermatozoides não sobreviveriam (MOORE et al., 2013).

A mistura de espermatozoides e secreção oriunda da vesícula seminal é, logo a seguir enriquecida pela secreção prostática. A próstata não é uma glândula, mas um conjunto de 30

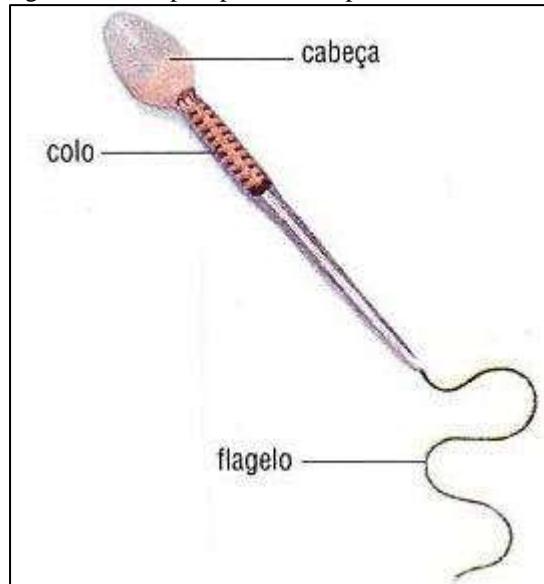
glândulas que estão imersas em um tecido conjuntivo e envolta por fibras musculares lisas, estas últimas contribuem para a expulsão do sêmen na ejaculação. No caso, a próstata produz cerca de 30% do volume ejaculado (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004).

Logo abaixo da próstata também são encontradas estruturas conhecidas como glândulas bulboretais ou de Cowper. Essas glândulas são responsáveis pela secreção de um fluido lubrificante da uretra que facilita a ejaculação diminuindo lesão tecidual devido à pressão do ejaculado na uretra (fluido pré-ejaculatório). A uretra, que é a última estrutura interna que liga-se ao exterior é subdividida em três partes principais: porção prostática, uretra membranosa e esponjosa. A uretra peniana é um tubo que leva a urina da bexiga para o exterior, no ato da micção, e no sexo masculino, a uretra dá passagem ao sêmen durante a ejaculação. (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004).

A espermatogênese ocorre a partir da puberdade masculina, quando por ação dos hormônios hipotalâmicos, a parte interna dos túbulos seminíferos que até então não passava de um maciço de células, sofre apoptose, tornando-se oca. Esta alteração permite que os espermatozoides produzidos se acumulem e sejam transportados para o epidídimo (MOORE et al., 2013, BIONLINE, 2016).

Após a espermatogênese, as espermátides formadas sofrem cito transformação (espermio gênese) dando origem ao espermatozoide que é composto por três regiões principais: cabeça e cauda ou flagelo, unidas pelo colo (Figura 2). A cabeça é formada pelo núcleo e pelo acrossomo (estrutura modificada a partir do complexo de Golgi). O acrossomo secreta zimogênio, e enzimas como a acrosina e a hialuronidase, que são essenciais a penetração do gameta oócito (MOORE et al., 2013).

Figura 2: Principais partes do espermatozoide



Fonte: Google Imagens

A espermatogênese pode ser afetada e assim gerar infertilidade por temperatura, criptorquidia, quimioterapia, varicocele, deficiências nutricionais e agentes estressores como estresse oxidativo (MOORE et al., 2013, BIONLINE, 2016).

A concentração de espermatozoides em um ejaculado considerado normal é de cerca de 150 a 200 milhões de espermatozoides. Cerca de 0,1% chega as tubas uterinas, local onde ocorre a fertilização. Espermatozoides humanos podem sobreviver por até 85 horas nas tubas uterinas. Porém não há comprovação da sua capacidade de fertilização após este longo período (BOSMIKIC, 2008).

1.2 INFERTILIDADE E MEDICINA REPRODUTIVA

A infertilidade é considerada uma doença que afeta a população mundial, uma vez que 70 milhões de casais (aproximadamente 15%) que desejam conceber apresentam problemas de infertilidade (BOIVINI et al., 2007). No caso, a infertilidade masculina é responsável por 40-50% dos casos de insucesso reprodutivo (GNOTH et al., 2005). Makuch e colaboradores (2011), estimaram que no Brasil, existam cerca de 4 milhões de casais inférteis.

Estima-se que mais de um milhão de procedimentos de técnicas de reprodução assistida (TRA) são realizados por ano, entretanto somente 30% dos casais obtêm sucesso no tratamento. Assim, apesar dos avanços na medicina reprodutiva, ainda se faz necessário melhorar os procedimentos para aumentar a eficácia do tratamento (ESTEVES et al., 2012).

O sucesso da TRA depende em grande parte da qualidade do espermatozoide, sendo o espermograma o exame inicial na avaliação da infertilidade de causa masculina. Tradicionalmente, o diagnóstico da infertilidade masculina está baseado na avaliação macroscópica e microscópica através do espermograma. A coleta do sêmen é realizada em ambiente Laboratorial privativo e adequado, por masturbação. É recomendado que na data da coleta o homem esteja em abstinência sexual há pelo menos 3 dias. O material coletado (sêmen), é analisado a olho nu (macroscopicamente) e através do microscópio (microscópica) quando se verifica a concentração, motilidade e morfologia dos espermatozoides como indicadores de qualidade do sêmen humano (BARROSO et al., 2009). Os parâmetros recomendados pela OMS estão descritos na tabela 1 (análise macroscópica) e tabela 2 (análise microscópica).

Tabela 1: Parâmetros a serem considerados na análise macroscópica do Espermograma

Análise Macroscópica		
Parâmetros	Descrição	Valores de referência
Cor e aspecto	Apresentação da amostra pode variar de acordo com a concentração e elementos presentes na amostra.	Branco opalescente
Tempo de liquefação	Tempo gasto para a amostra do material se tornar líquida completa.	≤ 60 minutos
Volume em mililitros (ml)	Volume total ejaculado.	≥ 1,5 ml
Viscosidade	Este parâmetro pode variar entre normal ou aumentada.	Normal
pH	pH do líquido seminal apresenta-se básico.	≥ 7,2

Fonte: OMS, 2010

Tabela 2: Parâmetros a serem considerados na análise microscópica do Espermograma

Análise Microscópica		
Parâmetros analisados	Descrição	Valores de referência
Concentração por ml	Quantidade de espermatozoides por ml.	$\geq 15,0$ milhões por ml
Concentração total	Quantidade de espermatozoides no volume total do ejaculado.	$\geq 39,0$ milhões no ejaculado
Motilidade progressiva (MP)	Espermatozoides que se movem em sentido direcional (deslocam em uma direção).	≥ 32 % MP
Motilidade não progressiva (NP)	Espermatozoides que movem a cauda, mas não se deslocam.	40% MP + NP
Imóvel	Espermatozoides sem motilidade.	
Morfologia (ou forma): critérios estabelecidos por Kruger, chamados de morfologia estrita	Análise do formato, do tamanho do espermatozoide, de sua cauda e a peça intermediária que liga estas porções.	$\geq 4\%$ de ovais normais
Vitalidade	Teste utilizado para os pacientes que possuem 40 % de espermatozoides imóveis e que nos dá a porcentagem de espermatozoides vivos na amostra.	$\geq 58\%$ de espermatozoides vivos
Concentração de células redondas	Células indiferenciadas presentes na amostra e, em geral, representam as células da espermatogênese.	$\leq 1,0 \times 10^6$ /ml
Concentração de leucócitos	Concentração de leucócitos por ml na amostra	$\leq 1,0 \times 10^6$ /ml

Fonte: OMS, 2010

Esses indicadores fornecem informações fundamentais da qualidade espermática, nas quais os clínicos se baseiam para o diagnóstico inicial. É de fundamental importância, portanto, que o exame seja executado por profissionais bem treinados e realizados em um laboratório com rigoroso controle de qualidade. A acurácia e a reprodutibilidade dos resultados fornecidos pelo laboratório facilitam ao clínico estabelecer a melhor linha diagnóstica e terapêutica (ESTEVES et al., 2011).

Embora os parâmetros acima descritos sejam largamente utilizados para diferenciar homens férteis e subférteis, existe ampla variação de fertilidade mesmo nos homens com parâmetros normais. Os valores de referência utilizados pela OMS publicados em 2010 foram estabelecidos com base em resultados de análises seminais de um grupo de aproximadamente dois mil homens, de oito países, que foram capazes de engravidar suas parceiras por via natural até um ano após o término da contracepção. Os valores dos parâmetros espermáticos desses homens foram distribuídos em uma curva, gerando valores médios e intervalos de confiança para diversos percentis. Estabeleceram-se como valores de referência aqueles obtidos no percentil 5, ou seja, 95% dos indivíduos considerados férteis possuíam análises seminais cujos parâmetros espermáticos eram maiores ou iguais aos observados nesse percentil (COOPER et al.; 2010).

Esses valores de referência não devem, portanto, ser utilizados para uma distinção rígida entre homens férteis e inférteis, embora sirvam para auxiliar na avaliação das chances de concepção. Os resultados de análise seminal de um paciente devem ser interpretados em conjunto com as informações clínicas (ESTEVEES et al.; 2012)

1.3 ESTRESSE OXIDATIVO E FERTILIDADE MASCULINA

Células eucarióticas apresentam diversos processos metabólicos que podem gerar uma classe especial de moléculas denominadas Espécies Reativas de Oxigênio (EROs). Por exemplo, na produção de energia (adenosina trifosfato, ATP) via reações mitocondriais que utilizam o oxigênio, o ânion superóxido que é um EROs é continuamente formado. Evidências mostraram que pequenas quantidades altamente controladas de EROs podem ser importantes na sinalização de alguns processos bioquímicos e moleculares das células. Entretanto, quando essas moléculas são produzidas em níveis elevados e descontrolados elas podem desencadear um processo denominado “estresse oxidativo” que é muito danoso para qualquer tipo de célula corporal (AGARWAL et al., 2016).

Embora existam evidências de que o estresse oxidativo seja um importante mecanismo associado à infertilidade masculina, pouco se progrediu no desenvolvimento de métodos para a análise desse fator e desenvolvimento de terapias antioxidantes. (BANSAL, 2011).

Pequenas concentrações de EROs também são fundamentais para a fisiologia do espermatozoide participando: na condensação da cromatina, no ajuste do número de células germinativas pela indução de apoptose das células excedentes e na proliferação das espermatogônias. Porém, grandes concentrações dessas moléculas danificam as membranas (lipoperoxidação) e o DNA dos espermatozoides causando mutações e quebras no material genético. Ou seja, o estresse oxidativo está associado à redução da capacidade de fertilização, ao comprometimento do desenvolvimento embrionário, e a um maior índice de aborto e de morbidades presentes na prole. Evidências sugeriram que as principais fontes de EROs no esperma são os leucócitos e os espermatozoides imaturos (AGARWAL et al.; 2002; BAKER et al.; 2005; LANE et al.; 2014).

Todos os componentes celulares, incluindo os lipídeos, as proteínas e os ácidos nucleicos são potenciais alvos das EROs. Entretanto, a extensão dos danos causados pelas EROs depende da natureza, da quantidade e da duração da exposição a essas moléculas (AGARWAL et al., 2014).

Os lipídeos, presentes na membrana plasmática dos espermatozoides na forma de ácidos graxos poli-insaturados, são considerados as macromoléculas mais suscetíveis à ação das EROs. Devido ao alto conteúdo de ácidos graxos insaturados e à falta de mecanismos de reparo, os espermatozoides humanos são células particularmente sensíveis aos danos mediados pela peroxidação lipídica (DE LAMIRANDE et al., 1993). As EROs atacam os ácidos graxos da membrana celular desencadeando uma cascata de reações químicas denominada peroxidação lipídica. Como resultado deste processo, ocorre um prejuízo na função do espermatozoide, com redução da motilidade e da capacidade de fusão ao oócito (AGARWAL et al., 2002; AGARWAL et al., 2004).

O aumento da formação de EROs está relacionado à redução da motilidade dos espermatozoides pelo desencadeamento de uma cascata de eventos que resulta na fosforilação de uma proteína axonemal e consequente imobilização dessas células. Outra hipótese sugere que o peróxido de hidrogênio pode se difundir através das membranas das células e inibir a atividade de enzimas como a glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH). Este processo acarreta uma diminuição da biodisponibilidade de NADPH e o concomitante acúmulo de glutatona oxidase e glutatona redutase. Essas alterações podem causar diminuição das defesas antioxidantes dos espermatozoides, o que resulta na potencialização da peroxidação dos fosfolipídeos da membrana (AGARWAL et al., 2002).

1.3.1 Apoptose em espermatozoides

A apoptose é um fenômeno fisiológico que ocorre a partir de estímulos intra e extracelulares e tem como objetivo eliminar células anormais ou supérfluas. Podendo ser considerada um mecanismo de controle de qualidade dos espermatozoides (SCHUFFNER et al., 2009). Ainda em 1996 um estudo de Baccetti e colaboradores demonstrou alta incidência de células com características apoptóticas em ejaculados de homens inférteis, estudos subsequentes corroboraram este achado (SCHUFFNER et al., 2009).

Para células espermáticas considera-se o modelo de morte induzida, onde alterações endócrinas levam à secreção do ligante do receptor de morte Fas . O receptor Fas é uma proteína

de superfície celular que pertence à família dos receptores TNF (Fator de necrose tumoral). O sinal apoptótico induzido por Fas é inicializado quando um ligante de Fas se une ao receptor, o que dispara uma via iniciada por caspase-8, que culminará com a ativação de caspases -3, -6, e -7, envolvidas com a fragmentação de DNA, inibição do reparo cromossômico e fragmentação celular (PAASCH et al., 2004; BUSTAMANTE FILHO et al., 2005).

Um dos eventos desse fenômeno é a translocação da fosfatidilserina (FS) para a face externa da membrana plasmática, considerado o principal marcador bioquímico de apoptose em espermatozoides. Durante a apoptose a enzima transferase aminofosfolipídica, uma enzima seletiva para aminofosfolipídios como a FS e fosfatidiletanolamina é inibida e a escamlase, uma proteína responsável pela translocação de fosfolípidos entre duas monocamadas da membrana celular, é ativada, assim ocorre a translocação da FS para a face externa da membrana plasmática, e essas alterações acabam por estimular a remoção de células apoptóticas por fagocitose (SCHUFFNER, 2008).

Tesarik e colaboradores (2006) sugerem que dentro do componente celular do tecido testicular, as caspases desempenham um papel central no processo apoptótico que leva à fragmentação do DNA de células de Sertoli. A caspase 3 parece ativar um fator de fragmentação de DNA, estando envolvida diretamente nos danos e na degradação da cadeia de DNA .

Wang e colaboradores (2003), realizaram estudo com 35 pacientes inférteis e 8 normais, com o objetivo de avaliar em espermatozoides ejaculados os níveis de citocromo c e caspases 9 e 3 e examinar a associação entre qualidade do sêmen e apoptose na presença de estresse oxidativo. A fragmentação dos espermatozoides foi acentuada em espermatozoides com imunocoloração positiva para caspase 3 e observou-se correlação positiva com baixa mobilidade espermática. Os resultados demonstraram que homens inférteis apresentaram ainda níveis significativamente mais altos de Citocromo c, caspase 9, e estresse oxidativo medido via EROS. Demonstrando-se assim, correlação entre apoptose espermática e infertilidade em homens.

Um dos mecanismos capazes de desencadear a morte celular programada (apoptose) é a elevação dos níveis de EROs que potencialmente provocam danos ao DNA, causando deleções, ligações cruzadas, rearranjos, modificações nas bases, quebras de fitas simples e duplas, mutações pontuais, enfim uma série de danos que culminam com a redução da qualidade espermática (AITKEN et al.; 2016).

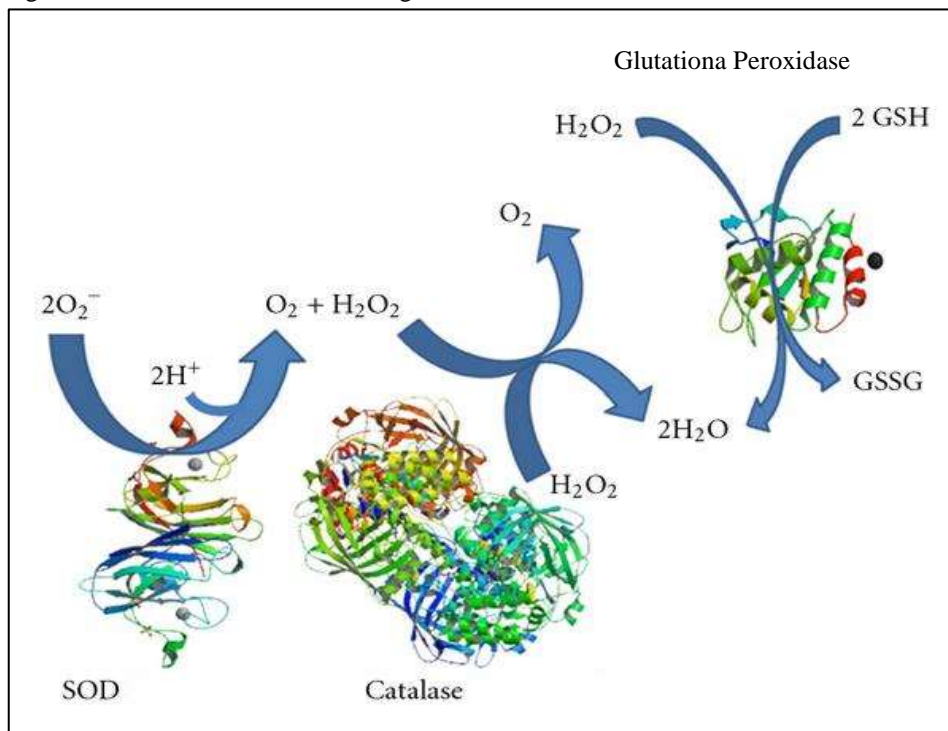
Os danos no DNA de espermatozoides além de estarem relacionados a taxas reduzidas de fertilização estão ligados a problemas na pré-implantação e embriogênese bem como incidência aumentada de morbidades na prole (LEWIS e SIMON, 2010).

Os níveis de EROS são controlados através dos sistemas de defesa antioxidante exógeno adquirido via alimentação e principalmente via a ocorrência de um sistema endógeno que funciona através da ação de enzimas antioxidantes (MONTAGNER, 2012).

1.3.1 Sistema de defesa Antioxidante Endógeno

O sistema antioxidante endógeno ou enzimático inclui enzimas importantes como as superóxido dismutases (SODs), catalase (CAT), o sistema tioredoxina, a glutathione peroxidase (GPX), e heme oxigenase. A principal reação antioxidante está relacionada com a catálise dos íons superóxido (O^{2-}) produzidos a partir do oxigênio que não foi utilizado nos ciclos bioquímicos mitocondriais para a produção do ATP. Neste sistema antioxidante, os íons superóxido são catalisados pela superóxido dismutase (SOD) que é considerada a primeira enzima de defesa contra o estresse oxidativo produzido pelo metabolismo normal. As SODs dismutam eficientemente todo o O^{2-} em H_2O_2 (peróxido de hidrogênio). Este último é então detoxificado em água e oxigênio pela catalase e/ ou glutathione peroxidase (Figura 3), (JOHNSON, 2002).

Figura 3: Sistema Antioxidante Endógeno, destacando as enzimas detoxificadoras SOD/CAT e GPX.



Fonte: Adaptada de Mello e colaboradores, 2011.

Existem três isoformas das SODs: A SOD2 dependente de manganês que atua na mitocôndria, a Cu/ZnSOD dependente de cobre-zinco no citosol e a SOD extracelular age nos compartimentos extracelulares (ZELKO et al., 2002).

A SOD2 é a enzima superóxido dismutase mais relevante por atuar dentro da mitocôndria, na qual ocorre a maior produção de $\text{O}_2^{\cdot-}$ celular. Investigações em seres humanos têm sugerido que a vulnerabilidade ao estresse oxidativo é parcialmente determinada por variações genéticas que modificam a eficiência das enzimas antioxidantes e estão associadas a diversos tipos de morbidades crônicas (FORSBERG et al., 2001; BARRATT et al., 2010). Este é o caso de um polimorfismo identificado na enzima SOD2.

1.4 POLIMORFISMO VAL16ALA DA SUPERÓXIDO DISMUTASE 2

A atividade da SOD2 é essencial para a sobrevivência dos mamíferos, como mostrado em uma investigação com camundongos geneticamente modificados, que não possuíam o gene da SOD2 (*Knockout*), os animais morreram logo após o nascimento devido ao dano oxidativo

exacerbado, além de apresentarem alterações morfofuncionais importantes, incluindo miocardiopatia dilatada e neurodegeneração (LI et al.,1995).

A SOD2 é uma molécula homotetramétrica composta por tetrâmeros de aproximadamente 21 kDa por subunidade. Tal enzima é codificada pelo gene nuclear da SOD2 , localizado no cromossomo 6 , braço longo região q25.3. Como essa enzima é sintetizada a partir de um gene nuclear, inicialmente é produzida uma proteína SOD2 inativa que estruturalmente é homotetrâmero, o qual se liga a um íon de manganês por subunidade. A SOD2 inativa sintetizada no retículo endoplasmático rugoso é enviada para o interior da mitocôndria graças a presença de uma pequena sequência peptídica denominada sequência mitocondrial alvo (*mitochondrial target sequence*, MTS). Ao passar pelos poros da membrana mitocondrial interna, o segmento peptídico MTS é então clivado por lisossomos, e a proteína madura se agrega em uma forma ativa tornando-se uma enzima funcional (ZELKO et al., 2002; SUTTON et al., 2003).

Estudos genéticos têm descrito um polimorfismo de substituição simples (*single nucleotide polymorphism*, SNP) no códon 16 da região MTS da proteína SOD2 onde ocorre a substituição de uma alanina por uma valina. Deste modo, existem três genótipos possíveis na população humana: AA, VV e AV. O alelo A determina a síntese de uma proteína alfa-hélice que possui grande eficiência de transporte e entrada na mitocôndria. Já o alelo V determina a síntese de uma proteína com estrutura beta-lâmina que fica parcialmente retida nas membranas mitocondriais (SHIMODA-MATSUBAYASHI et al.,1996).

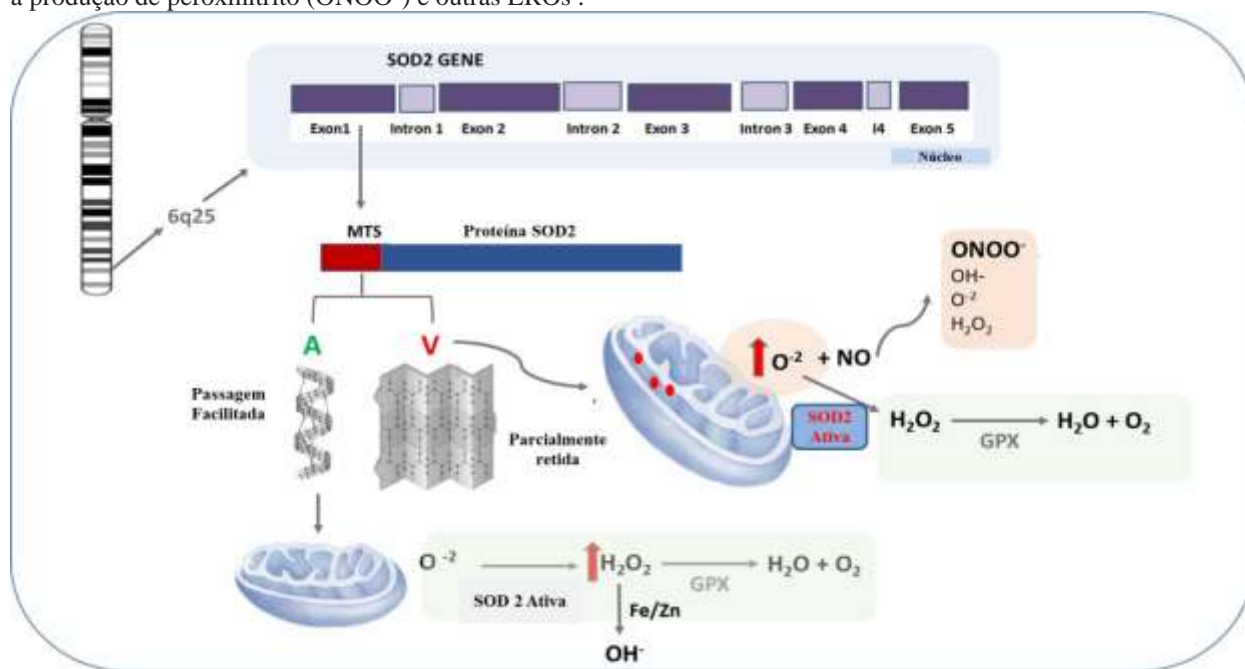
Essas condições acarretam consequências no desempenho da enzima. No caso, portadores do genótipo AA possuem uma maior facilidade em entrar na mitocôndria e, por consequência, maior eficiência na dismutação do superóxido. Por outro lado, portadores do genótipo VV possuem uma maior dificuldade de entrada enzimática para a mitocôndria e, por consequência, menor eficiência na dismutação do íon superóxido (BARBISAN et al., 2014).

Esta observação é proveniente de estudos *in vitro* que utilizaram a importação de proteínas quiméricas em camundongos e mostraram que o precursor Ala-MnSOD gerado é 30–40% mais ativo no processamento do homotetramero SOD2, que o precursor Val-MnSOD. Conseqüentemente o Ala-MnSOD/MTS permite uma importação eficiente da MnSOD para o interior da matriz mitocondrial, enquanto a variante Val causa uma retenção parcial do precursor dentro a membrana interna e diminui a formação do homotetramero MnSOD ativo na matriz mitocondrial (SUTTON et al.,2003).

Evidências epidemiológicas têm demonstrado que o genótipo Ala-Ala (AA) pode alterar o transporte da enzima para o interior da mitocôndria, e apesar da maior eficiência do alelo A, muitos estudos epidemiológicos têm descrito associação entre essa variante genética e o câncer de próstata (TAUFER et al.,2005), mama (BICA et al.,2009), pulmão e estômago (ZEJNILOVIC et al., 2009). Assim, acredita-se que esse fenômeno ocorra devido a maior eficiência da SOD2, que se não for acompanhada por um aumento nos níveis de GPX e CAT, ou de compostos antioxidantes não enzimáticos armazenados na célula, resulta na geração excessiva de H₂O₂. O H₂O₂ pode reagir com metais de transição via reação de Fenton, originando o radical hidroxila (OH[•]), que leva a lesões no DNA e por isso a predisposição ao desenvolvimento de Câncer (BARBISAN et al., 2014).

Investigações epidemiológicas adicionais têm sugerido que o genótipo VV possui menor eficiência enzimática da SOD2 e, com isso, acúmulo do ânion radical O₂^{•-} dentro da mitocôndria. Assim, o genótipo VV-SOD2 tem sido associado com aterosclerose da carótida (KAKKO et al., 2003), com cardiomiopatia dilatada não familiar em indivíduos japoneses, com altos níveis de LDL oxidado (ox-LDL), em indivíduos brasileiros com efeito sinérgico em pacientes com diabetes tipo II (GOTTLIEB et al., 2005). Abaixo a figura 4, mostra uma visão geral do polimorfismo.

Figura 4: Esquema Geral do Polimorfismo Val16Ala-SOD2 O alelo A produz uma proteína alfa-hélice, que passa com facilidade pelos poros da membrana mitocondrial, originando assim uma SOD2 mais eficiente, sem regulação positiva da glutatona-peroxidase, tem-se excesso de H_2O_2 , que pode migrar para o citoplasma e reagir com íons metálicos produzindo radicais hidroxila que podem provocar extensos danos principalmente na molécula de DNA. O alelo V produz uma proteína beta-lâmiba que é parcialmente retida nos poros da na membrana mitocondrial, diminuindo assim a eficiência da SOD2. O excesso de Superóxido pode reagir com o óxido nítrico (NO) ocasionando a produção de peroxinitrito ($ONOO^-$) e outras EROs.



Fonte: O autor

Os fatos acima mencionados sugerem um “paradoxo” no polimorfismo da SOD2, dado que, principalmente, as variantes homocigóticas (AA e VV) causam um desequilíbrio na modulação antioxidante, levando ao aumento dos níveis de superóxido em indivíduos VV ou níveis de peróxido de hidrogênio em indivíduos AA. Pode-se dizer que essa situação gera um desbalanço superóxido-peróxido de hidrogênio (S-PH).

Em ambos os casos, interações ambientais parecem aumentar ou diminuir o risco de morbidades não transmissíveis como as neoplasias e doenças cardiovasculares, como é sugerido em um estudo que descreve uma interação entre este polimorfismo e padrões de dieta antioxidante e outras variáveis do estilo de vida como o hábito de fumar no risco de câncer no pulmão (AMBROSONE et al., 1999; TAMIMI et al., 2004).

1.5 POLIMORFISMO VAL16ALA-SOD2 E BIOLOGIA REPRODUTIVA

Ainda que incipientes alguns estudos sobre o potencial efeito do polimorfismo Val16Ala-SOD2 na biologia reprodutiva humana estão sendo conduzidos. No caso, Ruiz-Sanz et al. (2011) investigaram se o polimorfismo Val16Ala SOD2 estava associado com infertilidade e taxa de gravidez em ciclos de fertilização *in vitro* (FIV). Nesse estudo, no grupo que foi submetido à FIV, correspondia a 25% das pessoas genótipo AA em 25% e 28% VV. Esses autores estudaram 148 mulheres inférteis que se submeteram a ciclos de FIV, das quais 44 ficaram grávidas e 104 não. As mulheres portadoras do genótipo AA apresentaram uma taxa de gravidez mais alta na FIV do que os outros genótipos. O genótipo AA do polimorfismo Val16Ala SOD2 foi considerado um preditor independente da ocorrência de gravidez em ciclos de FIV. A partir desses resultados, os autores sugeriram que a defesa antioxidante, particularmente na mitocôndria, poderia contribuir no sucesso da FIV. Por outro lado, isso significaria que mulheres portadoras dos genótipos VV teriam maior dificuldade de sucesso reprodutivo do que as AA.

Um estudo *in vitro* complementar mostrou que o polimorfismo Val16Ala SOD2 estava associado a uma resposta antioxidante diferencial ao fármaco citrato de clomifeno que é utilizado para averiguar os níveis de reserva ovariana ou mesmo no tratamento de mulheres com distúrbios reprodutivos como é o caso das pacientes com síndrome dos ovários policísticos (COSTA et al., 2012). Tal estudo corroborou a influência do desbalanço S-HP na biologia reprodutiva feminina.

Outra investigação conduzida por Ji e colaboradores (2012) testou a hipótese de associação entre variantes genéticas de diversas enzimas antioxidantes, incluindo o polimorfismo Val16Ala SOD2 com infertilidade de homens chineses. Nesta pesquisa os autores observaram que a presença do alelo V estava associada aos níveis elevados de fragmentação de DNA e que este alelo aumentava o risco de infertilidade. Este estudo é de grande relevância ainda que investigação similar necessite ser conduzida em populações caucasianas uma vez que associações genéticas com distúrbios e disfunções são fortemente influenciadas pela origem étnica das populações (PARRA et al., 2003).

Com base nas evidências científicas anteriormente comentadas, pareceria que a análise dos níveis de estresse oxidativo no sêmen e do dano do DNA espermático poderiam ser usadas na investigação das causas de infertilidade, especialmente em pacientes com esterilidade sem causa

aparente, assim como no desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para melhorar as taxas de sucesso das TRAs.

Da mesma forma, vários autores consideram insuficiente a avaliação do fator masculino de infertilidade somente pelo espermograma (CHI et al., 2011; LOFT et al., 2003; LOMMIELLO et al., 2015). Assim, um teste fluorimétrico que detecte rapidamente o dano do DNA espermático e que não requer alto nível de preparo técnico, seja importante a ser desenvolvido e agregado à avaliação tradicional da fertilidade masculina. Desse modo, a identificação de potenciais causas que diminuem a qualidade dos espermatozoides e que podem ser corrigidas *in vitro* ou *in vivo* antes da fertilização é de grande interesse, a investigação destes aspectos possui relevância clínica, farmacológica e científica.

1.6 METIL VIOLOGÊNIO (PARAQUAT)

O metil viologênio ou paraquat ((dicloreto de 1,1'- dimetil – 4,4'- bipyridínio), é um herbicida, utilizado na agricultura para o controle de uma variedade de ervas daninhas, comercialmente conhecido como Gramoxone® e disponível em solução a 20%, é um herbicida de contato que, pelo baixo preço, grande eficácia e ausência de efeito poluente para os solos, é largamente utilizado (SERRA et al., 2003).

O paraquat é um herbicida de baixa toxicidade crônica, uma vez que é rapidamente desativado em contato com o solo. Ao longo dos últimos anos, tem sido muito utilizado como modelo de estudo em estresse oxidativo tanto *in vivo* quanto *in vitro*. Ao reagir com NADPH, é reduzido ao radical paraquat. Sua reação espontânea com oxigênio gera radical superóxido, regenerando o paraquat que, por sua vez poderá novamente ser reduzido. Sua toxicidade é associada à produção de superóxido, uma vez que seu efeito é inibido após administração de SOD (SERRA et al., 2003).

O paraquat não se liga às proteínas plasmáticas, pelo que o seu volume de distribuição é elevado (cerca de 1 a 2 L/Kg de peso)¹. Tem uma forte fixação aos tecidos, ocorrendo a fixação no pulmão muito precocemente (cerca de 4 horas após a ingestão). Não é metabolizado, sendo excretado por duas vias: pelo aparelho digestivo e pelo rim, quer por filtração glomerular quer por secreção tubular activa¹. A clearance do paraquat é superior à da creatinina³, variando o

tempo de eliminação entre 12 e 120 horas dependendo da gravidade da lesão renal (HONORE et al., 1994).

1.7 HIPÓTESE DO ESTUDO

Com base na revisão de literatura e no contexto atual que indica que o estresse oxidativo causado pelo aumento dos níveis de EROs pode atuar negativamente sobre a biologia e sucesso de fertilização dos espermatozoides o estudo aqui apresentado testou a seguinte hipótese: o desbalanço dos níveis de Superóxido e Peróxido de Hidrogênio gerados tanto pelo polimorfismo Val16Ala-SOD2 quanto pela indução farmacológica via exposição dos espermatozoides ao metilviologênio (paraquat) poderia afetar os parâmetros de fertilidade masculina via aumento do estresse oxidativo e fragmentação do DNA.

2-OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar o efeito do desbalanço genético causado pelo polimorfismo Val16Ala-SOD2 e farmacológico induzido pela suplementação com paraquat no metabolismo oxidativo e em indicadores de fertilidade masculina

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar os níveis de cfDNA no plasma seminal e sua associação com alterações em parâmetros de qualidade espermáticas determinados pela OMS em amostras de sêmen oriundas de espermogramas realizados por laboratório de análises clínicas;

- Analisar o efeito do desbalanço S-HP associado ao polimorfismo Val16Ala-SOD2 nos parâmetros de qualidade espermáticas determinados pela OMS e em marcadores do estresse oxidativo (lipoperoxidação, EROS e carbonilação de proteínas) em amostras de sêmen oriundas de espermogramas realizados por laboratório de análises clínicas;

- Analisar o efeito do desbalanço S-HP induzido pela exposição de espermatozoides ao paraquat nos parâmetros de qualidade espermáticas determinados pela OMS e em marcadores do estresse oxidativo (lipoperoxidação, EROS e carbonilação de proteínas) em amostras de sêmen fresco oriundas de voluntários saudáveis.

3- RESULTADOS

Os resultados bem como a metodologia utilizada neste estudo estão organizados e apresentados sob a forma de dois manuscritos científicos. O 1º manuscrito está associado ao primeiro objetivo específico e o 2º manuscrito aos demais objetivos específicos.

Manuscrito 1: Seminal cell-free DNA levels measured by PicoGreen fluorochrome are associated with sperm fertility criteria.

Aceito para publicação em 25 de agosto pela Revista *Zygote*. Fator de Impacto: 1.37

Manuscrito 2: The Val16Ala-SOD2 polymorphism that causes superoxide-hydrogen peroxide imbalance influence some sperm fertility criteria.

Submetido ao *Journal of Human Fertility*. Fator de Impacto: 0.98

3.1 MANUSCRITO 1

Seminal cell-free DNA levels measured by PicoGreen fluorochrome are associated with sperm fertility criteria

Costa, F¹, Barbisan, F¹, Assmann, CE³, Araújo, NK², de Oliveira, AR², Signori, JP², Rogalski, F², Bonadiman, B¹, Fernandes, MS¹, da Cruz, IBM^{1,2,3*}.

¹ Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria-RS, Brazil.

²Laboratório de Biogenômica, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria-RS, Brazil.

³Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria-RS, Brazil.

*Corresponding author: Ivana Beatrice Mânica da Cruz. Laboratório Biogenômica. Universidade Federal de Santa Maria. Av Roraima 1000, Prédio 19, Santa Maria-RS, Brazil. Zipcode: 97105900. E-mail: ivana.ufsm@gmail.com.

ABSTRACT

Previous investigations suggested that elevated cell-free DNA (cfDNA) can indicate non-health states. However, the potential association between cfDNA seminal plasma levels and fertility sperm parameters was not yet determined. Therefore, the present study evaluated the association between seminal cfDNA levels and sperm fertility criteria to determine the use of seminal cfDNA quantification. A *in vivo* protocol quantified cfDNA levels of semen samples obtained from 163 male patients using a fluorescent PicoGreen dye staining. To confirm if semen cfDNA quantification is realistic an *in vitro* complementary test was performed using 3–4 semen samples. The fresh sperm samples were exposed to paraquat that generates high levels of superoxide anion causing oxidative stress and cell mortality. The results showed significant association between dsDNA levels and several sperm fertility parameters, such as low viability and alterations of motility and morphology. The *in vitro* analysis confirmed the association between dsDNA levels and sperm viability. These whole results suggest that dsDNA levels could be an important biomarker to test sperm fertility.

Summary sentence: high cfDNA levels in the semen is associated with infertility.

Key words: DNA, cell-free, fertility, sperm

INTRODUCTION

Healthy tissues are continually producing and destroying cells resulting in the presence of cell-free DNA (cfDNA) fragments in the blood derived from these dead cells. However, the plasma levels of free circulating cfDNA increase in some pathologies such as cancer, cardiovascular and autoimmune disorders, neurodegenerative syndromes such as spinocerebellar ataxias and infectious diseases (Swarup *et al.*, 2011; Yi *et al.*, 2014). A study performed by Czamanski-Cohen, *et al* (2013). also described an association between higher plasma cfDNA levels and low pregnancy rates among women undergoing *in vitro* fertilization embryo transfer.

Some previous investigations has been described correlation among parameters linked to normal sperm function and cfDNA levels present in semen. Li *et al* (2009) observed higher cfDNA levels in azoospermia than normospermia, whereas Chou *et al* (2004) observed association between low cfDNA quantity with rapid progression, curvilinear velocity, normal strict morphology and capacitation index. These authors also described that sperm freezing process did not influenced the cfDNA sperm concentration. Recent investigation also detected testis and epididymis-specific methylate promoters in human cfDNA (Xie *et al.*, 2004). Despite the great relevance of these studies, the most techniques used to quantify seminal cfDNA are expensive, spend a short time to be perform and present high sensibility to detect dsDNA. This is the case of polymerase chain reaction assay to detect cfDNA fragments. Moreover, for many clinical laboratories the use of these techniques is not realistic.

Therefore, the present investigation evaluated the use of DNA PicoGreen assay to determine seminal cfDNA because this dye is an ultrasensitive fluorescent nucleic acid stain for quantitating double-stranded DNA (dsDNA), with which it forms very stable complexes under alkaline conditions instead of ssDNA (single-strand DNA), proteins, SDS and urea (Levy *et al.*,

2000). We also evaluated in a large semen sample the potential association between cfDNA seminal levels with sperm parameters used to estimate the fertilization capacity preconized by the World Health Organization (WHO) (2010).

METHODS

Ethics

The study was approved by the Ethics Committee on human and animal research at the Federal University of Santa Maria in the number 0332.0.243.000-11. All procedures occurred in accordance with the principles set out in the Declaration of Helsinki. And participants signed informed consent term.

Study design and sample collection

To determine the use of seminal cfDNA quantification using PicoGreen dye, two complementary protocols were performed *in vivo* and *in vivo*. The *in vivo* protocol determined cfDNA levels using PicoGreen staining of semen samples from male patients that underwent a spermogram in a commercial clinical analysis lab (Pasteur, Santa Maria-RS, Brazil) to evaluate their fertility condition. The samples were obtained via masturbation after two to five days of ejaculatory abstinence and were analyzed within one hour following collection. After seminal liquefaction, a routine semen analysis was performed using computer-aided equipment, and sperm samples were classified according to the WHO (2010) specifications: concentration $\geq 15 \times 10^6$ sperm/mL; motility $\geq 40\%$; viability $\geq 58\%$; normomorphology $\geq 4\%$ and leukocytes in semen (LeS) $< 1 \times 10^6$ cells/mL. Two groups were found in the sperm evaluation: 27 (16%) considered fertile to all WHO criteria and 142 (84%) with, at least one infertile WHO criteria. After collection and determination of the WHO parameters, the sperm samples that were discarded were cryopreserved (~1 mL) to subsequently perform genetic and biochemical analyses

related to oxidative stress parameters. The semen samples were frozen at -80°C in the absence of a cryopreservative reagent to avoid interference in the evaluated biochemical variables. A brief protocol using sperm sample frozen with and without cryopreservative reagent did not show significant differences between cfDNA levels. Prior to analysis, the frozen samples were left at room temperature for 1 minute before further processing.

In vivo cfDNA determination by fluorimetric PicoGreen assays

The seminal cfDNA was determined in a black, 96-well plate using a Quant-iT™ PicoGreen® kit purchased from Invitrogen (Eugene, OR, USA) and diluted in TE buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7.5) with reagents of the highest purity/grade purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). The fluorimetric analyses were performed by using a SpectraMax M2/M2e Multi-mode Plate Reader, (Molecular Devices Corporation, Sunnyvale, CA, USA) at an excitation of 480 nm and an emission of 520 nm recorded at room temperature. To improve the experiment by avoiding oxidative light effects on the reaction, the incubation periods of H_2O_2 and PicoGreen® were conducted in darkness. Since the fluorimeter equipment is highly sensitive, three replications were carried out on each sample. A DNA quantification curve was performed using calf DNA purchased from Sigma-Aldrich.

The semen samples were centrifuged at 300 g for 10 minutes. Ninety microliters of TE buffer was added to each well of a 96-well black microplate, into which 10 μL of sperm plasma sample was diluted. Then, 100 μL of the PicoGreen dye diluted 1:200 in TE buffer was added to the microplate in order to make a final volume of 200 μL per well. Following incubation in the dark for 10 minutes at room temperature, the fluorescent signal of the sample was measured at 480 nm excitation and 520 nm emission using Gemini XPS (Molecular Devices, Sunnyvale, USA). Each sample was assessed in triplicate. The SoftMax Pro 5.4.1 program was used to

establish the standard curve and calculate the concentrations of the semen samples. Double-strand DNA quantified by PicoGreen is highly stable in the first 120 min reaction (Cadonaet *al.*, 2014). The unit of measure was fluorescence (fcDNA).

In vitro cfDNA determination by fluorimetric PicoGreen assays

To confirm the cfDNA quantification by the PicoGreen assays, an *in vitro* test was also performed using 3–4 semen samples obtained in conditions similar to those described in the *in vivo* approach. The fresh sperm sample (seminal plasma plus sperm cells) was exposed with different paraquat concentrations (0.1, 1, 3 and 10 μM). Paraquat is an organic compound that interferes with electron transfer by reduction of an electron donor such as NADPH in the mitochondria and increasing the superoxide anion levels (Bus & Gibson, 1984). After a 60-min exposure, the samples were centrifuged at 300 g for 10 min, and seminal cfDNA levels were determined as previously described, as well as sperm viability. To confirm that paraquat treatment increased the oxidative stress in the sperm samples, ROS, lipoperoxidation and protein carbonylation levels were evaluated in seminal plasma.

Sperm viability was determined by flow cytometry using Annexin-V-FITC and a propidium iodide (PI) staining kit (BD Pharmingen™). Annexin-V-FITC can detect early apoptotic processes, whereas PI staining allows identification of late-stage or necrotic apoptotic cells. The detection is realized through bonding between the cell receptors with these fluorescent compounds, Annexin-V and PI. The analysis was performed according to the manufacturer's instructions. Briefly, cells were seeded in 6-well plates at 1×10^6 cells per well in 2 mL of the different treatments. Following incubation, the sperm cells were washed twice with cold PBS and then resuspended in 1X Binding Buffer at a concentration of 1×10^6 cells/ml. The sperm cells were then transferred in 100 μL of solution (1×10^5 cells) to a 5-ml culture tube. Resuspended

sperm cells were gently vortexed and stained with 5 μ L of Annexin-V-FITC and 5 μ L of PI. Following a short incubation for 15 min in the dark at room temperature, 400 μ L of 1X Binding Buffer was added to each tube, and the cell fluorescence was analyzed by flow cytometry according to the manufacturer's specifications (Zhao *et al.*, 2014)

The ROS, lipoperoxidation and protein carbonylation levels of the sperm cells were determined. The ROS levels were determined by dichlorofluorescein diacetate fluorometric assays (DCF-DA) (Halliwell & Whiteman, 2004) with fluorescence measured at an excitation of 485 nm and an emission of 520 nm. Lipoperoxidation was spectrophotometrically estimated by the formation of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) as described by Jentzsch *et al.* (1983) and protein carbonylation by the method of Levine (Levine, 1983). All measurements were performed in triplicate.

Statistical analysis

All analyses were carried out using the SPSS software program (Version 21.0), and the results were expressed as the mean \pm standard deviation (SD) or percentage (%). In the *in vivo* analysis, association between seminal cfDNA levels and WHO sperm fertility criteria was determined by Student's t-tests. The percentile analysis of cfDNA levels was determined and the sample cut-off was the 75th percentile. The frequency distribution of higher cfDNA levels, sperm fertility criteria and other oxidative stress variables were analyzed by chi-square tests. A multivariate logistic regression (backward Wald) was also performed to evaluate the influence of age and other oxidative stress variables on the association between cfDNA levels and sperm fertility parameters. Data from *in vitro* analysis were compared by one-way analysis of variance followed by Tukey's *post hoc* tests. Pearson correlation and kappa concordance tests were performed to determine if seminal cfDNA levels were representative of sperm viability evaluated by flow cytometry. All statistical comparisons with $p \leq 0.05$ were considered significant.

RESULTS

A total of 163 semen samples from men of an average age of 35.89 ± 7.33 (minimum = 19; maximum = 63) were initially collected. The general sperm fertility parameters of the samples are presented in Table 1. The prevalence of low viability was 27.6% (n = 45); low concentration was 16% (n = 26); altered morphology was 9.8% (n = 16) and high leukocyte frequency was 36.2% (n = 59) (Table 1).

Table 1 General parameters evaluated in the semen samples SD=standart derivation# = determined by hyposmotic test.

Parameters		Mean \pm SD	Minimum	Maxim
Volume (mL)		3.2 \pm 1.3	1.0	7.5
Concentration (10^6 sperm/mL)		57.7 \pm 47.9	2.1	110.0
Viability		60.3 \pm 11.3	20.0	75.0
Motility	A	32.5 \pm .4	5.0	50.0
	B	20.6 \pm 6.0	10.0	40.0
	C	18.9 \pm 7.4	5.0	35.0
	D	27.9 \pm 12.8	10.0	70
Morphology expected (%)		24.3 \pm 7.2	61.0	93.0
Leukocytes (> 1%)		45.8 \pm 2.5	0.5	45.8

To evaluate the potential association between cfDNA levels determined by PicoGreen fluorescence and sperm fertility parameters, we initially compared this parameter between fertile group with group that presented, at least one infertile parameter. The mean \pm SD cfDNA seminal plasm in fertile group was significantly lower ($0.869 \pm 0,79$ nm) than group with infertile parameters (3.657 nm) ($p=0.006$).

As the volume or sperm concentration are two fertile parameters we evaluated its influence on cfDNA levels. The results showed that semen volume was not associated with cfDNA levels, whereas sperm concentration interfered with fluorescence values (Figure 1). For this reason, seminal cfDNA values of the samples were corrected to sperm concentrations and estimated to be 111.5 ± 95.7 nm (minimum = 9.6; maximum = 820.6 nm) (Fig. 1).

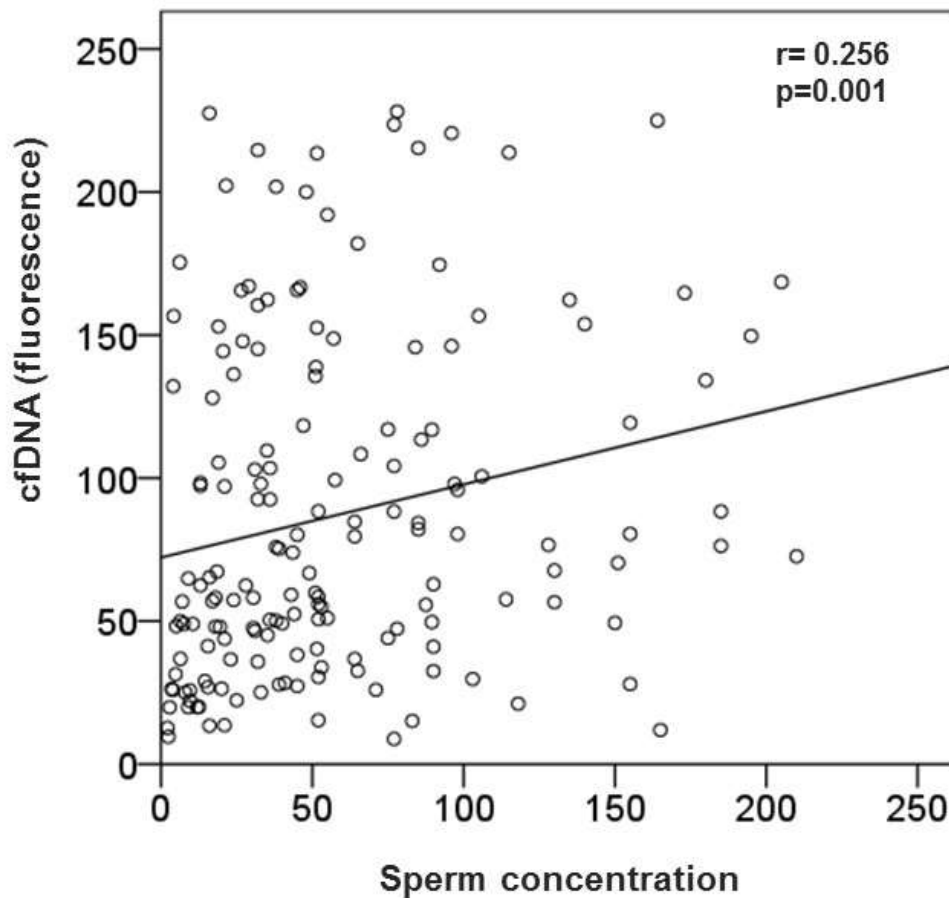


Figure 1: Association between seminal cfDNA fluorescence and sperm concentration determined by linear regression.

All four sperm fertility criteria were significantly associated with higher seminal cfDNA levels: $V_{exp} = 1.2 \pm 1.2$; $V_{alt} = 4.0 \pm 5.4$; $M_{exp} = 2.8 \pm 4.3$; $M_{alt} = 5.2 \pm 6.6$; $MO_{exp} = 2.5 \pm 3.1$; $MO_{alt} = 9.9 \pm 10.0$; $L_{exp} = 1.9 \pm 2.5$; $L_{alt} = 5.4 \pm 6.8$ nm. However, due to the high variance

observed and non-parametric distribution of cfDNA values a second analysis was performed that initially evaluated the cfDNA percentile distribution in each sperm fertility criteria (Fig. 2).

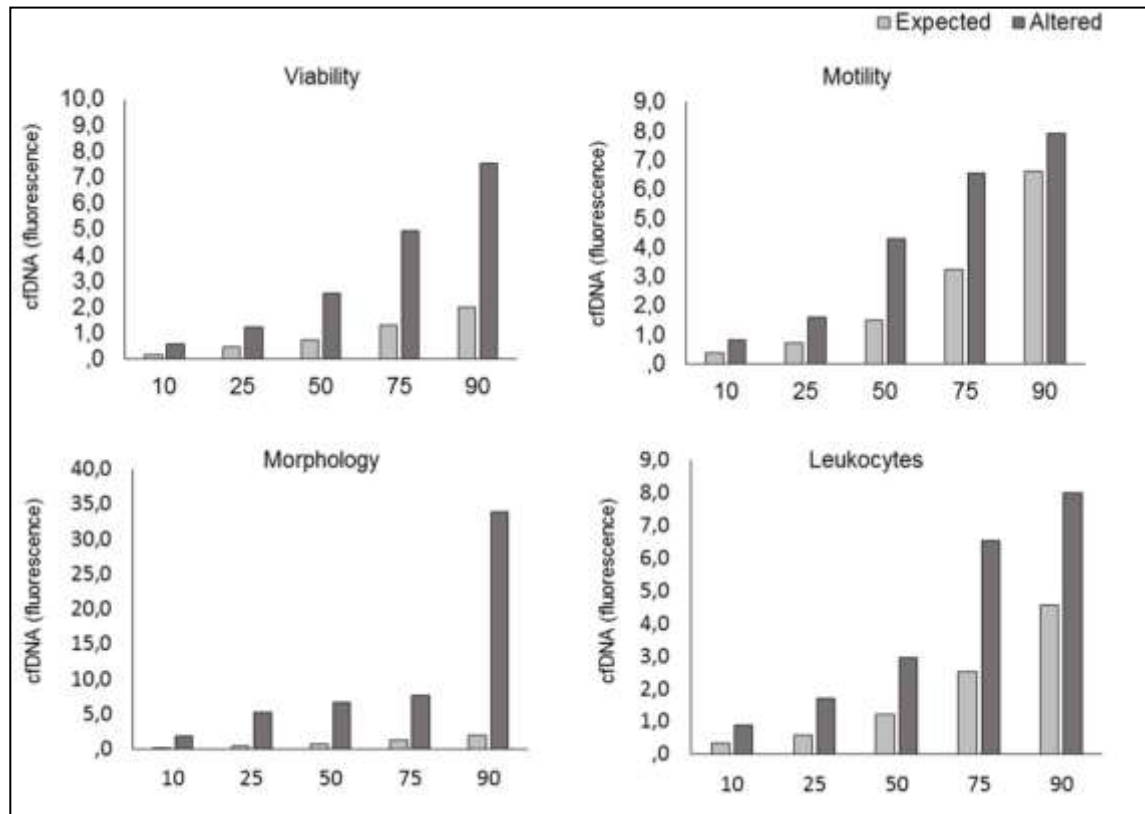


Figure 2 Percentile distribution of seminal cfDNA fluorescence values corrected by sperm concentrations considering four expected and altered sperm fertility parameters: viability; motility; morphology and presence of leukocytes.

The 75th percentile cfDNA values of altered variables were: viability = 5.0; motility = 6.6; morphology = 7.7 and leukocytes = 6.6. From these results a mean cfDNA value was calculated and used as a cut-point to classify the sample into the following two groups: higher cfDNA values of ≥ 6.5 and moderate or low values of < 6.5 fluorescence. The frequency of higher cfDNA values was significantly related to all criteria investigated here (Fig. 3).

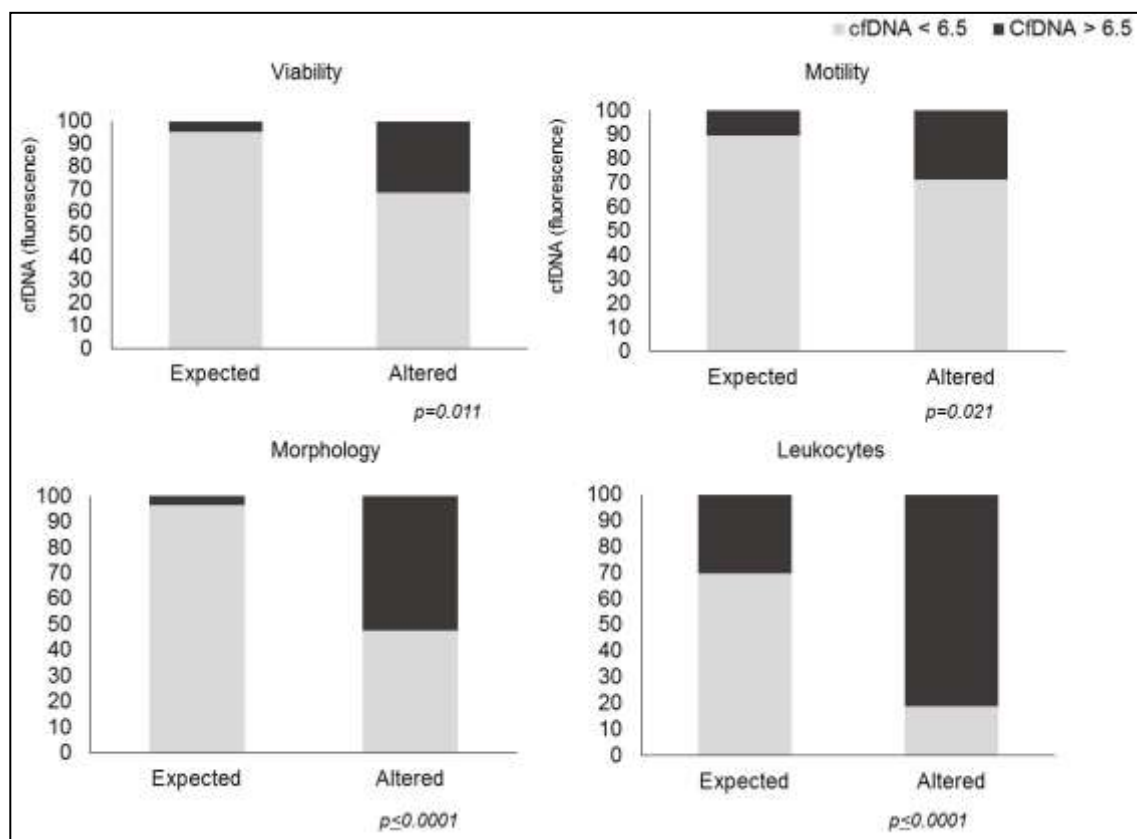


Figure 3 Frequency distribution of seminal cfDNA levels in sperm fertility altered and expected parameters. P values derive from chi-square statistical tests or Exat Fisher tests that compared each sperm fertility parameter with low and moderate cfDNA levels (< 6.5 fluorescence) and high cfDNA levels (≥ 6.5 fluorescence).

The cfDNA categorization allowed for the calculating odds ratios between altered cfDNA levels and sperm fertility parameters. Sperm samples with cfDNA ≥ 6.5 fluorescence presented a 1.39 (95%CI = 1.20–1.6) higher chance of altered viability; 2.72 (95%CI = 1.19–6.24) more chance to have altered mobility; 14.98 (95%CI = 5.78–38.4) more chance to have altered morphology and 2.69 (95%CI = 1.94–3.73) when compared with samples that presented expected parameters preconized by the WHO.

From these results, we analyzed if seminal cfDNA levels could be associated with other seminal plasma oxidative stress variables such as ROS, lipoperoxidation, and protein

carbonylation. To avoid misinterpretation, we also corrected these variables to the sperm concentration of each sample. All oxidative variables evaluated here were significantly higher in samples that presented high seminal cfDNAs (≥ 6.5 fluorescence) (Table 2).

Table 2 Comparison of oxidative stress variables in semen samples categorized with low/moderate seminal cfDNA fluorescence levels (< 6.5) and high cfDNA fluorescence levels (> 6.5).

Variables	cfDNA < 6.5		cfDNA ≥ 6.5		P
	Mean \pm SD	Median	Mean \pm SD	Median	
ROS	26.0 \pm 26.4	17	107.5 \pm 78.3	82	≤ 0.001
Lipoperoxidation	0.12 \pm 0.20	0.05	0.38 \pm 0.37	0.22	≤ 0.001
Protein carbonylation	0.12 \pm 0.19	0.08	0.48 \pm 0.29	0.48	≤ 0.001

ROS = reactive oxygen species; SD= standard deviation. Groups were statistically compared by non-parametric Mann-Whitney tests since the values did not present a normal distribution.

Considering the potential use of seminal cfDNA quantification by PicoGreen dsDNA assays to detect sperm samples with altered fertility parameters, a complementary *in vitro* analysis was performed to determine levels in controlled conditions (Table 3).

Table 3 Multivariate analysis between the association of WHO sperm fertility criteria and oxidative stress variables.

Sperm fertility parameter	Variables in equation	p	OR (95% CI)
Vitality	ROS	0.013	5.42 (1.43–20.48)
	dsDNA	0.010	7.39 (1.16–33.93)
Concentration	Lipoperoxidation	0.11	8.52 (1.65–44.06)
Motility	dsDNA	0.002	4.75 (1.79–12.6)
Morphology	Protein carbonylation	0.0001	6.65 (7.23–57.7)
	dsDNA	0.001	2.67 (4.67–15.22)
Leukocytes	ROS	0.0001	11.74 (4.65–19.63)

Multivariate analysis was performed for each sperm fertility parameter by logistic regression (backward Wald method). Only variables that maintained significance to each sperm fertility parameter are presented.

Initially, analysis of oxidative stress indicators was performed to confirm the toxicological effects of different paraquat concentrations on sperm samples (Fig. 4). The superoxide levels presented a dose-dependent increase in the sperm samples confirming the generation of ROS by paraquat exposure. Nitric oxide levels did not change in the samples exposed to different paraquat concentrations. ROS and lipoperoxidation presented higher levels only in sperm samples exposed to 3 μM paraquat. However, all paraquat concentrations increased the levels of protein carbonylation when compared to the control group (Fig. 4).

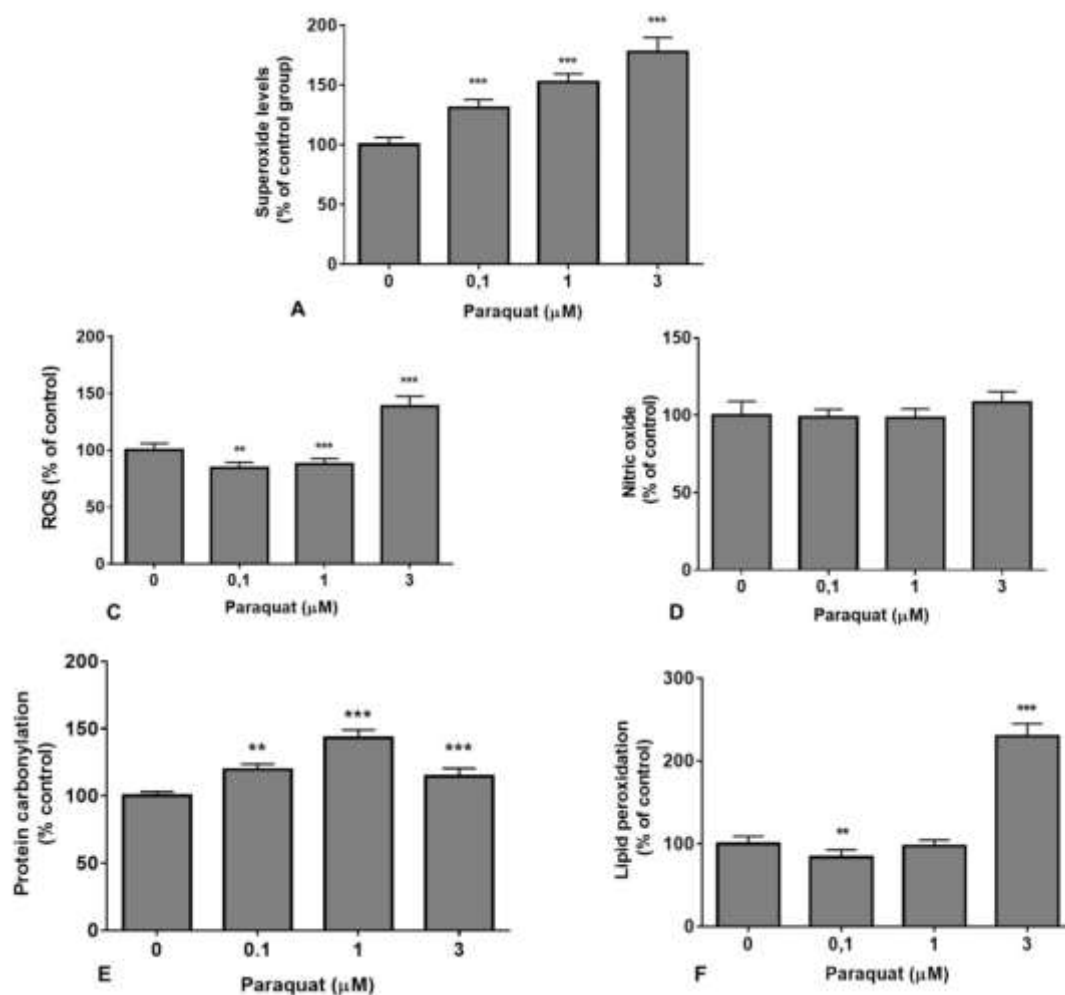


Figure 4 :Oxidative indicator levels of sperm samples after a one-hour exposure to various paraquat concentrations. The treatments were compared with untreated groups by ANOVA followed by Dunnet *post hoc* tests. **p = 0.01; *** p = 0.0001.

The *in vitro* analysis confirmed the association between dsDNA levels and sperm viability. Sperm obtained from samples and mixed with buffer media with and without varying paraquat concentrations presented different dsDNA concentrations after one-hour exposures (Fig. 5A). Maximal dsDNA concentrations were observed after exposure to 3 μM paraquat when compared to the control group and other low doses. Flow cytometry analysis confirmed higher sperm mortality after exposure to 3 μM paraquat (Fig. 5 B). A significant correlation between high dsDNA levels and dead cells levels by flow cytometry indicated that dsDNA concentrations reflect sperm viability (Fig. 5 C). An additional analysis showed higher numbers of apoptotic cells in the presence of paraquat (Fig. 5 D).

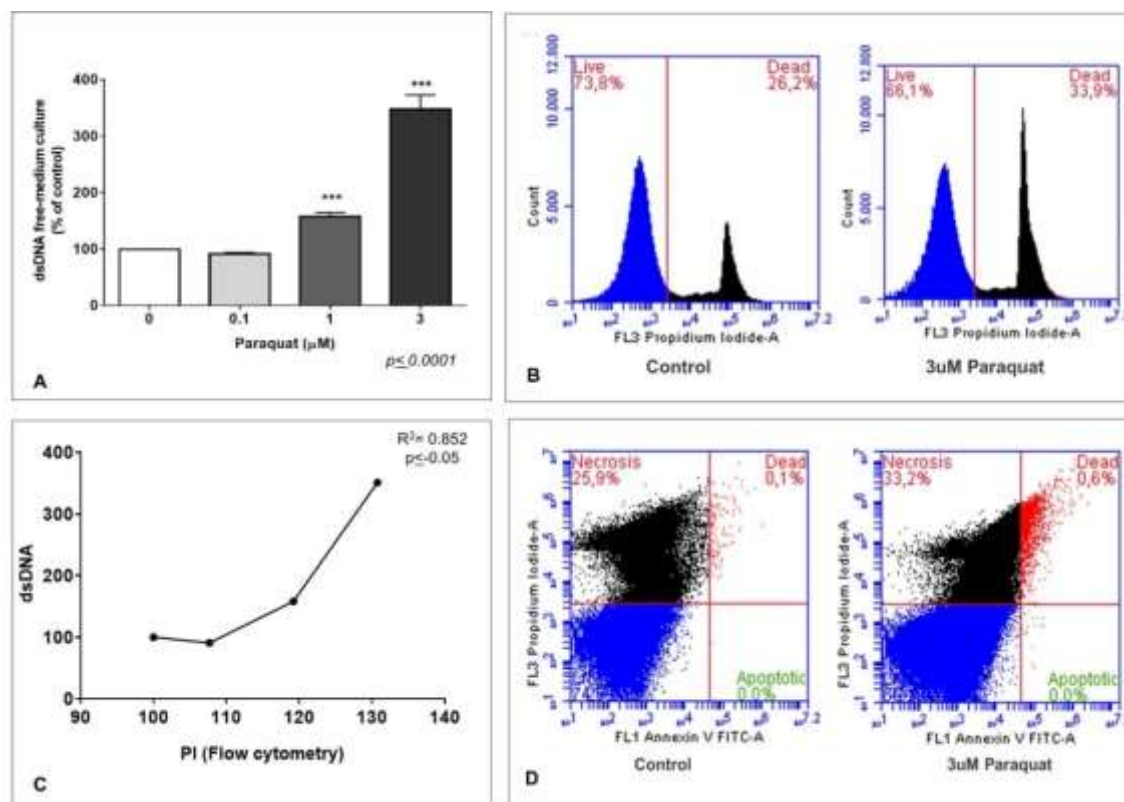


Figure 5 Comparison of sperm samples after one-hour exposures to varying paraquat concentrations. (A) Supernatant dsDNA levels were measured by PicoGreen fluorescence in

sperm. The treatments were compared with untreated groups by ANOVA followed by Dunnet *post hoc* tests. *** $p = 0.0001$. (B) Representative flow cytometry of living and dead samples determined by propidium iodide staining of control sperm and those exposed to 3 μM paraquat. (C) Correlation between dsDNA levels and dead cells determined by flow cytometry and statistically analyzed by Pearson's correlation tests. (D) Representative flow cytometry of living and dead samples determined by Annexin V immunohistochemistry to determine the frequency of apoptosis in control sperm and those exposed to 3 μM paraquat.

DISCUSSION

Previous evidence has highlighted the central role of oxidative stress on the etiology of sperm DNA damage (Swarup & Rajeswari, 2007; Zhu *et al.*, 2005; Bus & Gibson, 1984) and the potential role in the etiology of male fertility (Wu *et al.*, 2002; Bus & Gibson, 1984). For this reason, some authors consider that microscopic assessment including the concentration, motility and morphology of sperm could be insufficient to diagnose male infertility. However, it has not yet been clarified how the parameters used to determine the potential fertility of sperm account for altered states of oxidative stress. The whole of results showed that DNA Picogreen assay can be used to detect seminal cfDNA quantification and these values presented association with WHO sperm fertility parameters and higher levels of at least one oxidative stress variable analyzed here. The results confirmed the Li *et al* (2009) study that described association with cfDNA seminal plasma and normozoospermia and azoospermia using PCR amplification analysis. Despite the high specificity of PCR technique used by these authors, by a large number of Clinical Lab the use of this methods would be realistic, whereas an assay using fluorescent DNA quantification, as DNA Picogreen dye could be more feasible.

Therefore, the present study investigated semen samples obtained from men who had undergone clinical laboratory sperm analyses (Fig. 5).

To test the potential association between WHO sperm fertility parameters and oxidative stress variables, we chose to analyze only seminal plasma, because this reflects the natural oxidative microenvironment conditions in which sperm are immersed. Seminal plasma is easy to collect and analyze without requiring additional procedures, such as sperm membrane rupture to access the internal cell contents, which increases the complexity and cost of evaluation, whether we consider the possible incorporation of these biochemical tests on traditional spermogram analysis. A complementary *in vitro* protocol was performed to confirm the association between dsDNA levels, sperm oxidative stress and viability. The results showed that dsDNA evaluation reflects sperm viability as well as oxidative stress status.

Considering previous studies that suggested a potential influence of Val16Al-SOD2 SNP on male fertility, we also determined the genotypes of this polymorphism using DNA extracted from sperm samples (Zhang *et al.*, 2014; Cadona *et al.*, 2014). Our results showed an association between the VV-genotype and at least one altered sperm fertility criteria, but not with one specific criteria. This result was not consistent with those of Yan *et al.*, 2014 who reported an association between the AA genotype and Chinese male infertility. However, both homozygous genotypes cause oxidative imbalance and are influenced by other lifestyle variables such as diet (Cadona *et al.*, 2014), and therefore this apparent controversy is not so crucial. Even though this polymorphism can contribute to some modulation of biochemical oxidative stress variables, the results together suggest that this genetic variable is not a good marker associated with sperm fertility parameters.

On the other hand, our results are consistent with those reported by Iommiello *et al.* (2015) of an association between oxidative stress caused by superoxide anions, sperm DNA fragmentation and high concentrations of round cells. Even though we did not determine the superoxide anion levels (due to limitations of seminal plasma volume to perform this and

complementary analyses), our results showed an association between higher lipoperoxidation levels and all sperm fertility parameters evaluated. The negative effects of high superoxide anion levels were confirmed in the *in vitro* protocol performed in the present investigation. This association can reflect a superoxide anion imbalance that in high levels can react with nitric oxide producing peroxynitrite, an important reactive nitrogen species (RNS). Nitrosative stress causes nitration and oxidation of lipids, protein and DNA. A recent *in vitro* investigation performed by Uribe *et al.* (2015) showed that sperm exposed to a molecule that generates peroxynitrite decreased progressive and total motility and mitochondrial membrane potential without decreasing sperm viability. The authors suggested that nitrosative stress could cause male infertility.

An independent association between higher levels of protein carbonylation and altered sperm morphology were found in our study. These results corroborate previous results describing a significant association between higher protein carbonylation with altered sperm morphology (Shiva *et al.*, 2011). Higher ROS levels were independently associated with a higher frequency of leukocytes.

One new marker used in the present study was the quantification of free dsDNA in seminal plasma. In fact, dsDNA is present only in viable cells, and therefore the detection of dsDNA fragments in blood or seminal plasma may reflect the occurrence of cell death. Surprisingly, dsDNA levels were the marker that presented an independent association with multiple sperm fertility variables (low viability and alterations of motility and morphology). To our knowledge, this is the first work reporting an association between free dsDNA levels and sperm alterations. Therefore, dsDNA levels correlated with alterations in all three sperm fertility patterns, and the analysis of this marker is relatively easy.

Despite the methodological limitations of our study design, including the lack of some lifestyle and health information of males when semen samples were obtained, the results suggest that the traditional WHO sperm fertility parameters reflect oxidative stress imbalance. Another important consideration from our results is that different oxidative variables are independently associated with different sperm fertility parameters.

Endogenous and exogenous factors that contribute to oxidative stress are involved and in many cases are easily modifiable. Antioxidants play a protective role, although a delicate balance of reduction and oxidation is required for essential sperm function, including fertilization. Reducing oxidative stress may improve a couple's chances of conception either naturally or via assisted reproduction treatment. Sources of oxidative stress, therefore, should be thoroughly examined in men with high levels of DNA fragmentation and modified where possible.

REFERENCES

- Bus, J.S., Gibson, J.E. (1984). Paraquat: model for oxidant-initiated toxicity. *Environ Health Perspect* 55, 37-46.
- Cadona, F.C., Manica-Cattani, M.F., Machado, A.K., Oliveira, R.M., Flores, E.R.S., Assmann, C., Algarve, T.D., Cruz, I.B.M. (2014). Genomodifier capacity assay: a non-cell test using dsDNA molecules to evaluate the genotoxic/genoprotective properties of chemical compounds. *Anal. Methods* 6, 8559-8568.
- Chou, J.S., Jacobson, J.D., Patton, W.C., King, A., Chan, P.J. (2004). Modified isocratic capillary electrophoresis detection of cell-free DNA in semen. *J Assist Reprod Genet* 21, 397-400.
- Czamanski-Cohen, J., Sarid, O., Cwikel, J., Lunenfeld, E., Douvdevani, A., Levitas, E., Har-Vardi, I. (2013). Increased plasma cell-freeDNA is associated with low pregnancy rates among women undergoing IVF-embryo transfer. *Reprod Biomed Online* 1, 36-41.
- Halliwell, B., Whiteman, M. (2004). Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Br J Pharmacol* 2, 231-255.
- Iommiello, V.M., Albani, E., Di Rosa, A., Marras, A., Menduni, F., Morreale, G., Levi, S.L., Pisano, B., Levi-Setti, P.E. (2015). Ejaculate Oxidative stress is related with sperm DNA fragmentation and round cells. *Int J Endocrinol* 32, 1901-1907.
- Jentzsch, A.M., Bachmann, H., Fürst, P., Biesalski, H.K. (1893). Improved analysis of malondialdehyde in human body fluids. *Free Radic Biol Med* 2092, 251-256.
- Levine, R.L. (1983). Oxidative modification of glutamine synthetase. I. Inactivation is due to loss of one histidine residue. *J Biol Chem* 258, 11823-11927.

- Levy, M.S., Loptian, P., Kennedy, R.O., Lo-Yim, M.Y., Shamlou, P.A. (2000). Quantitation of supercoiled circular content in plasmid DNA solutions using a fluorescence-based method. *Nucleic Acids Res* 1, 28:57.
- Li, H.G., Huang, S.Y., Zhou, H., Liao, A.H., Xiong, C.L. (2009). Quick recovery and characterization of cell-free DNA in seminal plasma of normozoospermia and azoospermia: implications for non-invasive genetic utilities. *Asian Journal of Andrology* 11, 703–709
- Shiva, M., Gautam, A.K., Verma, Y., Shivgotra, V., Doshi, H., Kumar, S. (2011). Association between sperm quality, oxidative stress, and seminal antioxidant activity. *Clin Biochem* 4, 319-324.
- Swarup, V., Rajeswari, M.R. (2007). Circulating (cell-free) nucleic acids-a promising, non-invasive tool for early detection of several human diseases. *FEBS Lett* 581,795-799.
- Swarup, V., Srivastava, A.K., Padma, M.V., Rajeswari, M.R. (2011).Quantification of circulating plasmaDNA in Friedreich's ataxia and spinocerebellar ataxia types 2 and 12. *DNA Cell Biol*6, 389-394.
- Uribe, P., Boguen, R., Treulen, F., Sánchez, R., Villegas, J.V. (2015). Peroxynitrite-mediated nitrosative stress decreases motility and mitochondrial membrane potential in human spermatozoa. *Mol Hum Reprod* 3, 237-243.
- WHO (World Health Organization).(2010). WHO Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and SpermCervical Mucus Interactions. *Cambridge: Cambridge University Press* 2.
- Wu, T.L., Zhang, D., Chia, J.H., Tsao, K., Sun, C.F., Wu, J.T. (2002). Cell-freeDNA: measurement in various carcinomas and establishment of normal reference range. *Clin Chim Acta* 1, 77-87.
- Xie, G.S., Hou, A.R., Li, L.Y., Gao, Y.N., Cheng, S.J. (2004). Quantification of plasma DNA as a screening tool for lung cancer. *Chin Med J (Engl)* 10, 1485-1488.
- Yan, L., Liu, J., Wu, S., Ji, G., Gu, A. (2014). Seminal superoxide dismutase activity and its relationship with semen quality and SOD gene polymorphism. *J Assist Reprod Genet* 31, 549-554.
- Yi, J., Zhang, Y., Zhang, Y., Ma, Y., Zhang, C., Li, Q., Liu, B., Liu, Z., Liu, J., Zhang, X., Zhuang, R., Jin, B. (2014). Increased plasma cell-freeDNA level during HTNV infection: correlation with disease severity and virus load. *Viruses* 7, 2723-2734.
- Zhao, X., Huang, S., Luo, H., Wan, X., Gui, Y., Li, J., Wu, D. (2014). Evaluation of vesicular stomatitis virus mutant as an oncolytic agent against prostate cancer. *Int J Clin Exp Med* 7, 1204-1213.
- Zhu, G., Ye, X., Dong, Z., Lu, Y.C., Sun, Y., Liu, Y., McCormack, R., Gu, Y., Liu, X. (2015). Highly sensitive droplet digital PCR Method for detection of EGFR-activating mutations in plasma cell-freeDNA from patients with advanced non-small cell lung cancer. *J Mol Diagn* 3, 265-272.

3.2 MANUSCRITO 2

The Val16Ala-SOD2 polymorphism that causes superoxide-hydrogen peroxide imbalance influence some sperm fertility criteria

Felipe Costa^{1a}, Fernanda Barbisan^{1b}, Charles Elias Assmann^{2a}, Andressa Duarte Seehaber^{3a}, Moisés Henrique Mastella^{3b}, Thiago Duarte^{1c}, Marta Maria Medeiros Frescura Duarte^{4a}, Ivana Beatrice Mânica da Cruz^{1,2,3*}

¹*Pharmacology Graduate Program, Federal University of Santa Maria (UFSM), Av. Roraima 1000, Prédio 21, Santa Maria, RS, ZIP Code: 97105900, Brazil. Tel.: + 55 55 32209382, E-mail:*

^afcosta26110@uol.com.br; ^bfernandabarbisan@gmail.com;

^cduartethiago89@yahoo.com.br

²*Toxicological Biochemistry Graduate Program, Federal University of Santa Maria (UFSM), Av. Roraima 1000, Prédio 18, Santa Maria, RS, ZIP Code: 97105900, Brazil. Tel.: + 55 55 32208978, E-mail: ^acharles.ufsm@gmail.com*

³*Biogenomics Laboratory, Federal University of Santa Maria (UFSM), Av. Roraima 1000, Prédio 19, Santa Maria, RS, ZIP Code: 97105900, Brazil. Tel.: + 55 55 32208163, E-mail: ^aandressa_ds142@hotmail.com, ^bmhmastella@gmail.com*

⁴*Center of Health Sciences, Lutheran University of Brazil, Av. Farroupilha, 8001, Canoas, RS, ZIP Code: 92425900, Brazil. Tel.: + 55 51 34774000, E-mail:*

^aduartmm@hotmail.com

* Corresponding author: ivana.ufsm@gmail.com

Biographical notes

Felipe Costa: Physician and Master in Pharmacology by the Federal University of Santa Maria (UFSM). PhD in Pharmacology in progress at UFSM. Works on the following areas: Infertility, Oxidative metabolism, Genetics and Pharmacology.

Fernanda Barbisan: Biologist by the West University of Santa Catarina and Master in Pharmacology by the Federal University of Santa Maria (UFSM). PhD in Pharmacology in

progress at UFSM. Works on the following areas: Genetics, Pharmacology, Oxidative metabolism, Inflammation and Molecular Biology.

Charles Elias Assmann: Biologist and Master in Biochemistry in progress at the Federal University of Santa Maria (UFSM). Works on the following areas: Genetics, Oxidative metabolism, Biochemistry and Molecular Biology.

Andressa Duarte Seehaber: Physician degree in progress at the Federal University of Santa Maria (UFSM). Works on the following areas: Genetics, Oxidative metabolism and Molecular Biology.

Moises Henrique Mastella: Biologist degree in progress at the Federal University of Santa Maria (UFSM). Works on the following areas: Genetics, Oxidative metabolism and Molecular Biology.

Thiago Duarte: Pharmacist and Master in Pharmacology by the Federal University of Santa Maria (UFSM). PhD in Pharmacology in progress at UFSM. Works on the following areas: Genetics, Pharmacology, Oxidative metabolism and Molecular Biology.

Marta Maria Medeiros Frescura Duarte: Pharmacist, Master and PhD in Biochemistry by the Federal University of Santa Maria (UFSM). Professor at the Lutheran University of Brazil. Works on the following areas: Pharmacology, Immunology, Physiology and Biochemistry.

Ivana Beatrice Mânica da Cruz: Biologist by the Federal University of Santa Maria (UFSM). Master and PhD in Genetics and Molecular Biology by the Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS). Professor at the Federal University of Santa Maria (UFSM). Works on the following areas: Genetics, Molecular Biology, Pharmacology, Physiology and Biochemistry.

The Val16Ala-SOD2 polymorphism that causes superoxide-hydrogen peroxide imbalance influence some sperm fertility criteria

The purpose of this study was to investigate the association between Val16Ala superoxide dismutase manganese dependent (SOD2) single nucleotide polymorphism (SNP) and sperm reproductive parameters of a sample of Brazilian men. Potential association between this polymorphism on some oxidative biochemical parameters and on sperm plasma cell-free DNA (cfDNA) levels were also evaluated. The study was performed using semen samples obtained from male patients that underwent a spermogram. The semen was classified according to the 2010 World Health Organization (WHO) specifications and Val16Ala-SOD2 SNP genotyped by polymerase chain reaction (PCR). Oxidative parameters as well as cfDNA levels were spectrophotometrically and fluorimetrically determined. Statistical analysis included chi-square test, analysis of variance followed by Bonferroni *post hoc* test, as well as logistic regression multivariate analysis. Semen samples from 169 men (35.89 ± 7.33 years) were genotyped. The allelic frequencies were V= 0.485 (n=97), A = 0.515 (n=103), been statistically similar allelic frequencies of samples obtained from a general population: V = 0.509; A= 0.591. In general, AV samples presented lower number sperm altered parameters than homozygous sperm. Lipoperoxidation was higher in homozygous than heterozygous sperm samples. Results suggest that S-HP imbalance genetically caused could contribute to poor sperm quality and affect man fertility.

Keywords: single nucleotide polymorphism, superoxide dismutase, oxidative stress, biochemical parameters, male infertility, Brazilian men.

Introduction

Evidence suggest that oxidative metabolism exerts important influence on human spermatozoa. In homeostatic conditions, reactive oxygen species (ROS) have a physiological role on maturation, capacitation and fertilization processes, especially in the acrosome reaction and oocyte membrane fusion (Opuwari & Henkel, 2016). Among these molecules, superoxide anion is constantly produced by spermatozoa mitochondrial electron transfer chain (Koppers, De Iuliis, Finnie, McLaughlin & Aitken, 2008). Leukocytes found in semen constitution also produce superoxide levels due to the same biochemical pathway (Henkel et al., 2005).

To control potential negative effects of superoxide and other ROS generated by reaction of this molecule and by other cellular processes, sperm presents an endogenous antioxidant

system that involves the action of superoxide dismutase enzymes (SOD2) that convert superoxide (S) anion in hydrogen peroxide (HP). Subsequently, the HP is catalysed by catalase (CAT) or glutathione peroxidase (GPX) enzymes to water (Opuwari & Henkel, 2016).

Previous studies have indicated association between SOD imbalance and sperm parameters associated with reproductive disorders. Lower semen SOD activity has been associated with oligoasthenozoospermy, altered spermatozoa morphology, mobility, lower viability and higher levels of DNA fragmentation (Hsieh et al., 2002; Macanovic et al., 2015; Murawski et al., 2007; Shamsi et al., 2010; Wdowiak, Bakalczuk & Bakalczuk, 2015; Yan et al., 2015). In fact, SOD2 is an enzyme that has a pivotal role against S anion produced into mitochondrial matrix of all cells, including sperm (Fridovich, 1995).

The association between oxidative stress that causes DNA damage to spermatozoa is also highly relevant to all assisted reproduction techniques (ARTs) since this condition cannot be recognized while selecting spermatozoa for this process (Henkel, 2007). Moreover, sperm DNA damage could have a negative impact on the health of the offspring (Opuwari & Henkel, 2016; Gavriliouk & Aitken, 2015).

Despite environmental factors associated with an increase in oxidative stress could be potentially controlled to improve the sperm quality, increase fertility outcome and the chance of no health problems in the offspring, there are some genetic influence, which could create basal oxidative imbalance. Humans present genetic polymorphisms in antioxidant enzymes that could affect sperm reproductive quality. An investigation performed by Ji et al. (2012) studied 11 single-nucleotide polymorphisms (SNP) from six antioxidant genes (GPX1, CAT, PON1, NQO1, SOD2/MnSOD, and SOD3) in a large sample of Chinese subjects. The results indicated that two

polymorphisms are associated with male infertility including SOD manganese-dependent Val16Ala-SOD2 (rs4880).

However, the results related to Val16Ala-SOD2 SNP was contrary to hypothesis of the authors, which expected to found association between VV and male infertility. In fact, Chinese male carriers A variant presented significant increased risk of infertility and higher levels of sperm DNA damage than VV subjects. This finding is biologically plausible since Val16Ala-SOD2 SNP cause S-HP imbalance in both homozygotes genotypes (VV and AA) due to differences in conformational SOD2-protein. Whereas V allele produces a beta-sheet SOD2, A-allele produces an alpha helix SOD2. In V allele case, SOD2-protein stays partially arrested in the mitochondrial membrane and VV presents a basal SOD2 low-efficiency than AV and AA carriers. On the other hand, A allele presents higher conversion of S anion into HP, but this efficiency is not followed by increase in the GPX levels. In consequence, AA has higher basal HP levels than AV and VV subjects. Several epidemiological studies have suggested that both homozygous genotypes have been associated with metabolic dysfunctions and chronic diseases (Bresciani, Cruz, de Paz, Cuevas & González-Gallego, 2013; Bresciani, da Cruz, González-Gallego, 2015).

Unfortunately, at the present moment studies in western populations to evaluate the impact of Val16Ala-SOD2 SNP on sperm quality were not performed. For this reason, we analysed the association between this SNP and sperm reproductive parameters of a sample of Brazilian men. We also evaluated the potential association between this polymorphism on some oxidative biochemical parameters and also on sperm plasma cell-free DNA (cfDNA) levels that indicates mortality and DNA fragmentation.

Material and Methods

Ethics, Patients and Samples

The study was approved by the Ethics Committee on human research at the Federal University of Santa Maria under the number 0332.0.243.000-11. All procedures were performed in accordance with the principles set out in the Declaration of Helsinki. The present investigation was conducted in 2014 and 2015 using semen obtained from male patients that underwent a spermogram in a commercial clinical analysis to evaluate their fertility conditions. A routine semen analysis was performed using computer-aided equipment, and sperm samples were classified according to the 2010 World Health Organization (WHO) specifications: concentration $\geq 15 \times 10^6$ sperm/mL; motility $\geq 40\%$; viability $\geq 58\%$; normomorphology $\geq 4\%$ and leukocytes in semen (LeS) $< 1 \times 10^6$ cells/mL.

After a part of the semen was collected and used in some spermogram analysis, the remainder of sample (~1 mL) was immediately -80°C stored until use to determine Val16Ala-SOD2 genotyping and to evaluate other parameters related with oxidative metabolism. To avoid delay in storage process, a cryopreservant was not added to the samples. However, the further analyses were performed as soon as the samples were thawed.

Val16Ala-SOD2 SNP genotyping

The semen samples were used to determine SOD2 allelic and genotype frequencies. Since the SOD2 genotyping was performed from men sperm samples and the frequencies could be different of general population, the SOD2 frequencies observed in sperm samples were compared with SOD2 frequencies of 171 healthy adult subjects living in the same place of Rio Grande do Sul (Brasil) with similar age. In both samples DNA was extracted used a commercial QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen) following the manufacturer's instructions. Val16Ala-SOD2 SNP genotyping was determined by polymerase chain reaction (PCR) as described by Barbisan et al. (2014). Briefly, two primer pairs were used to amplify and determine the genotype of a DNA

fragment containing the Val16Ala-SOD2 in the human SOD2 sequence. The 3'-end of the allele-specific primers is underlined. Underlined lowercase bases indicate the introduced mismatches. The PCR reaction was carried out in a total volume of 40 μ L containing 20-40 ng of genomic DNA as the template, 0.5 μ M of each primer, 100 μ M of each dNTP, 1.25 mM of MgCl₂, PCR buffer (20 mM Tris-HCl (pH 8.4), 50 mM KCl), 5% dimethyl sulfoxide (DMSO), and 1.25 Units of DNA polymerase. The PCR amplification was carried out with an initial denaturation at 94°C for 7 min, followed by 35 cycles of 60 s of denaturation at 94°C, 20 s of annealing at 60°C, and 30 s of extension at 72°C, and an additional 7 min of extension at 72°C at the end of the final cycle. A 20- μ L aliquot of the PCR products was mixed with 6 μ L of loading buffer and resolved by electrophoresis in a 1.5% agarose gel. This procedure resulted in three bands in heterozygotes (514, 366, and 189 bp) and two bands in homozygotes (Val/Val resulting in bands of 514 and 189 bp, and Ala/Ala resulting in bands of 514 and 366 bp).

Oxidative biochemical parameters analyses

The ROS, lipoperoxidation and protein carbonylation levels of sperm cell were determined. The ROS levels were determined by dichlorofluorescein acetate fluorimetric assay (DCF-DA) (Halliwell & Whiteman, 2004) with fluorescence measured at an excitation of 485 nm and an emission of 520 nm. Lipoperoxidation was spectrophotometrically estimated by the formation of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) as described by Jentsch et al. (1983) and protein carbonylation by the method of Levine (1983). All measurements were performed in triplicate.

cf-DNA quantification

The cf-DNA levels present in semen plasma was quantified according to Costa et al. (2016, in press) protocol. Briefly, 10 μ L of sperm plasma obtained from different volunteers were added in a 96-well black plate together with reagents from Quant-iT™ PicoGreen® kit purchased

from Invitrogen (Eugene, OR, USA) and diluted in TE buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7.5) with reagents obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Then, 100 μ L of the PicoGreen dye diluted 1:200 in TE buffer was added to the microplate in order to make a final volume of 200 μ L per well. Following incubation in the dark for 10 min at room temperature, the fluorescent signal of the samples was measured at 480 nm excitation and 520 nm emission at room temperature and recorded using a SpectraMax M2/M2e Multi-mode Plate Reader, (Molecular Devices Corporation, Sunnyvale, CA, USA). A DNA quantification curve was performed using calf DNA purchased from Sigma-Aldrich. Each sample was assessed in triplicate. The unit of measure was fluorescence (cfDNA).

Statistical analysis

All analysis were carried out using the SPSS software program (Version 21.0) and the results were expressed as the mean \pm standard deviation (SD) or percentage (%). The Val16Ala-SOD2 SNP genotype frequencies were initially calculated to Hardy-Weinberg equilibrium and were compared among different WHO sperm fertility criteria by chi-square test or Exact Fisher test. The oxidative parameters analysed here were compared among samples obtained from men carrying different Val16Ala-SOD2 genotypes by One-way analysis of variance followed by Bonferroni *post hoc* test. Dose effect analysis was also performed grouping AA and AV x VV genotypes and grouping VV and AV x VV genotypes. These analyses were performed using Student t test. A multivariate logistic regression (Backward Wald method) was also performed to evaluate the influence of age and oxidative parameters on the univariate significant association between Val16Ala-SOD2 SNP genotypes and sperm fertility. All statistical comparisons with $p \leq 0.05$ were considered significant.

Results

A total of 171 semen samples obtained from men with 35.89 ± 7.33 years old (minimum=19; maximum = 63) were initially collected. However, just in 169 samples was possible to perform the molecular and biochemical tests. The general sperm parameters evaluated were described in Table 1.

Table 1. General parameters evaluated in the semen samples.

Parameters	Mean \pm SD	Minimum	Maximum	
Volume (mL)	3.2 ± 1.3	1.0	7.5	
Concentration (10^6 sperm/mL)	57.7 ± 47.9	2.1	110.0	
pH	7.8 ± 0.26	7.5	8.50	
Viability	60.3 ± 11.3	20.0	75.0	
Motility	A	$32.5 \pm .4$	5.0	50.0
	B	20.6 ± 6.0	10.0	40.0
	C	18.9 ± 7.4	5.0	35.0
	D	27.9 ± 12.8	10.0	70
Morphology expected (%)	24.3 ± 7.2	61.0	93.0	
Morphology alteration (%)	Head	66.8 ± 8.0	48.0	88.0
	Neck	6.0 ± 6.2	2.0	85.0
	Tail	3.2 ± 2.0	1.0	10.0
Leukocytes (> 1%)	45.8 ± 2.5	0.5	45.8	
Immature germ cells (%)	2.3 ± 2.2	17.5	0.5	
Membrane integrity [#] (%)	60.3 ± 11.3	75.0	20.0	

SD= standard deviation; # = determined by hypo-osmotic test.

Figure 1 presents the frequency of expected WHO sperm parameters of samples. Sperm concentration and viability were the parameters that present higher alteration than others. Mean \pm SD sperm alteration was 1.50 ± 0.9 . Just 14.2% (n=24) were considered fertile for all WHO criteria whereas 145 (86%) presented, at least one infertile WHO criteria.

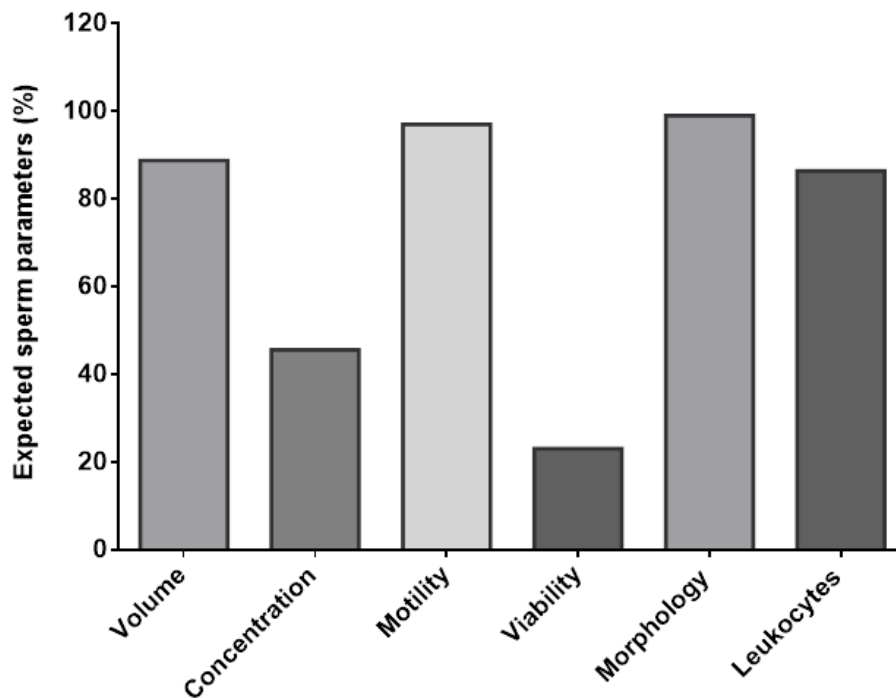


Figure 1. WHO expected sperm parameters (%): volume ≥ 1.5 mL, concentration $\geq 15 \times 10^6$ sperm/mL, motility (A+B+C) $\geq 40\%$, viability $\geq 58\%$, normal morphology $\geq 4\%$, and leucocytes in semen $< 1 \times 10^6$ cells/mL in all sperm sample (n=169).

The Val16Ala-SOD2 genotypes and allelic frequencies found in sperm samples and blood samples of healthy volunteers are presented in Figure 2. SOD2 genotype frequencies from sperm were similar to observed in general population (32.4 ± 7.9 years old). Both samples were in Hardy-Weinberg equilibrium (sperm sample $p < 0.312$; general population $p < 0.624$). In DNA sperm samples allelic frequencies were V = 48.5 (n=97), A = 51.5 (n=103) and in general population allelic frequencies were V = 0.509 (n=105), A = 0.591 (n=101).

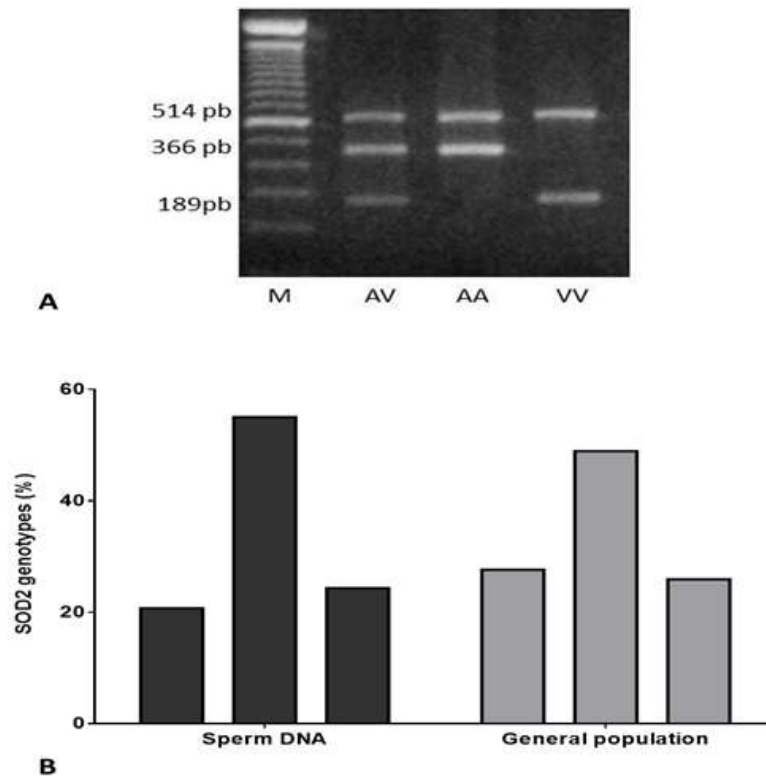


Figure 2. Val16Ala-SOD2 genotyping (A) electrophoresis gel presenting DNA fragments used to identify different genotypes; (B) Comparison between genotype frequencies of sperm samples and general population, that did not showed significant differences.

A significant association between SOD2 genotypes and number of altered sperm parameter was found (Figure 3). In general, heterozygous sperm presented lower number of at least one altered parameters (80.6%, n=75) than observed in homozygous sperm (VV= 91.4%, n=32; AA= 92.7%, n=38) ($p=0.034$). The risk of homozygous present at least one sperm altered pattern was 2.452 (95%CI=1.024-5.868) higher than AV genotype.

The frequency of altered sperm concentration was higher in VV and AA sperm (53.9%, n=41) than AV sperm (n=38.7%, 36) ($p=0.048$). The analysis of specific parameters showed

similar frequencies between heterozygous (AV) and homozygous (VV and AA) genotypes. A multivariate analysis showed that association between heterozygous and higher sperm concentration was independent of age ($p=0.038$) and sperm volume.

A complementary analysis compared some oxidative markers between heterozygous (AV) and homozygous (VV and AA) sperm samples (Table 2). Lipoperoxidation levels were higher in homozygous than heterozygous sperm samples. The other variables analysed here were similar between groups. A second analysis was performed in order to evaluate the potential association between sperm parameters and oxidative variables independent of Val16Ala-SOD2 genotypes. As can see in Figure 3, four parameters were significantly associated with number of altered sperm parameters. In samples with higher frequency of sperm alteration the levels of protein carbonylation, lipoperoxidation, ROS and cfDNA were higher ($p=0.001$).

Table 2. Comparison of oxidative variables between sperm DNA samples carriers heterozygous (AV) and homozygous (VV and AA) Val16Ala-SOD2 genotypes.

Variables	Heterozygous (AV) Mean \pm SD	Homozygous (VV/AA) Mean \pm SD	P
Protein carbonylation	0.171 \pm 0.970	0.173 \pm 0.155	0.893
Lipoperoxidation	0.151 \pm 0.112	0.234 \pm 0.195	0.044
ROS	33.67 \pm 24.11	39.13 \pm 27.98	0.477
Total polyphenols	0.034 \pm 0.01	0.039 \pm 0.02	0.293
cfDNA	85.1 \pm 51.71	89.3 \pm 53.96	0.582

Protein carbonylation= mmol/mg protein; ROS= DCF picomoles/mL; lipoperoxidation (TBARS)= mmol MDA/mg protein; cfDNA= fluorescence 480 nm. Statistic comparison was performed by Student T test.

Higher protein levels were found in sperm samples with lower concentration, motility, normomorphology and vitality. Higher lipoperoxidation levels were found in sperm samples with lower concentration. Higher ROS levels were found in lower concentration, normomorphology, motility and vitality. Higher cfDNA levels were found in sperm samples with lower

concentration, motility, normomorphology and vitality. Higher leukocytes levels were significantly associated just with higher cfDNA levels.

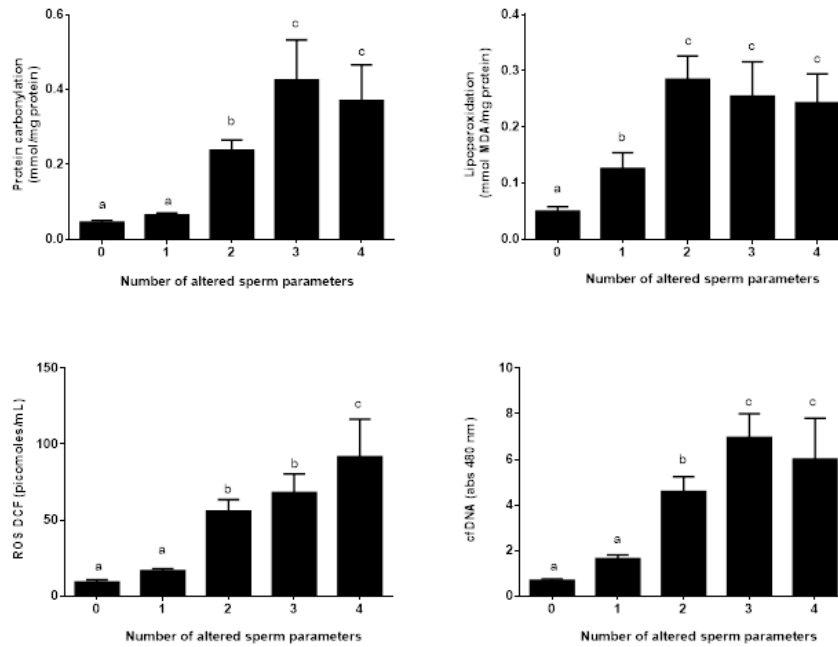


Figure 3. Comparison among oxidative variables and the number of altered sperm parameters by One-way analysis of variance followed by *post hoc* Bonferroni test. Different letters indicate significant differences at $p < 0.05$.

Discussion

Alterations in oxidative metabolism have been associated with the etiology of male fertility (Koppers et al., 2008) also involving lower levels of SOD2 enzyme (Murawski et al., 2007). For this reason was performed here a study to evaluate the potential association between Val16Ala-SOD2 SNP and WHO sperm fertility parameters. This analysis was performed since the polymorphism cause basal S-HP imbalance that could affect the sperm quality. The results

showed that sperm samples carrier's heterozygous genotype (AV) presented better sperm fertility parameters than homozygous samples (VV and AA).

Ji et al. (2012) previously performed a first study involving this polymorphism. However, the study found association just between AA genotype and sperm infertility markers. In fact, the authors postulated that higher SOD2 efficiency associated with A allele could represent a protective factor against oxidative damage of sperm cells. However, their results were contrary of this hypothesis. It is well established by other investigations that both SOD2 homozygous genotypes could contribute to S-HP imbalance.

The results described here have biological plausibility. Basal higher S levels associated with VV genotype could react with nitric oxide (NO) that is virtually produced by all cells resulting in higher peroxynitrite concentrations, which subsequently cause extensive lipoperoxidation in the cells. On the other hand, higher HP associated with AA genotype could react with metal ions in the cytoplasm generating hydroxyl radical. This free radical has high affinity to DNA causing extensive damage to this molecule. As the Chinese and Brazilian population differs substantially, perhaps there is some ethnical protective factors or lifestyle factors that attenuate the VV risk on sperm viability in the Chinese population. Despite this difference, the results found here corroborate the Chinese study since it was found association between SOD2 polymorphism and sperm fertility parameters. Complementary investigation in Chinese men performed by Yan et al. (2014) found association between AA genotype and lower SOD activity. However, these authors observed high influence of antioxidant dietary pattern in the results that could explain this unexpected result.

The independent association between sperm fertility parameters and oxidative markers found here is not a new result. Several studies have reported a negative impact of oxidative stress markers and sperm function (Sanocka, Miesel, Jędrzejczak, Chełmonska-Soyta & Kurpisz, 1997;

Iommiello et al., 2015; Uribe, Boguen, Treulen, Sánchez & Villegas, 2015; Shiva et al., 2011; Abasalt, Gholamali & Maryam, 2013). However, to the best of our knowledge the potential contribution of SOD2 polymorphism on increase of oxidative markers was not yet studied. Sperm carrier's both homozygous Val16Ala-SOD2 genotypes presented higher lipoperoxidation levels indicating a basal oxidative imbalance potentially associated with higher number of altered semen fertility parameters. These results are according with studies that indicate dual negative effects of S-HP imbalance associated with homozygous SOD2 genotypes published in the literature (Halliwell & Whiteman, 2004; Abasalt et al., 2013; Dos Santos Montagner et al., 2010; Montano et al., 2009; Bica et al., 2009; Taufer et al., 2005). However, most investigations generally suggest association of some risk with one genotype or other, not with both genotypes as described here. Due to the high sensitivity of sperm cells to oxidative imbalance, the heterozygous genotype that theoretically presents basal equilibrium in S-HP levels could be advantageous.

In addition, the results found here could be relevant to ART success, since the success of these procedures could be influenced by gamete oxidative stress (Ji et al., 2012). A previous investigation performed by Ruiz-Sans et al. (2011) evaluated the association between Val16Ala-SOD2 with infertility and pregnancy rate of *in vitro* fertility cycles. The authors found that AA genotype was an independent predictor of the occurrence of pregnancy in *in vitro* fertility.

As the study did not investigated father SOD2 genotypes, and the results presented here suggest that both SOD2 homozygous genotypes could present negative effect on sperm quality, the inclusion of SOD2 genotyping analysis in couples that search by ART procedures could be useful. However, complementary studies to evaluate the impact of this information in *in vitro* fertilization (IVF) management need to be performed.

To conclude, despite the methodological limitations related with our study design including the lack of some lifestyle and health information of male when semen sample were obtained and the limited number of samples analysed, the whole of results suggest some influence of S-HP imbalance associated with Val16Ala-SOD2 SNP on WHO sperm fertility parameters.

Acknowledgements

We thank Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) for financial support.

Disclosure of interest

The authors report no conflicts of interest.

References

- Abasalt, H.C., Gholamali, J.S., Maryam, G.C. (2013) Lipid peroxidation and large-scale deletions of mitochondrial DNA in asthenoteratozoospermic patients. *Indian Journal of Biochemistry & Biophysics*, 50, 492-9. Retrieved from: <http://nopr.niscair.res.in/handle/123456789/25164>
- Barbisan, F., Motta, J. de R., Trott, A., Azzolin, V., Dornelles, E.B., Marcon, M., Algarve, T.D., Duarte, M.M., Mostardeiro, C.P., Unfer, T.C., Schott, K.L., da Cruz, I.B. (2014) Methotrexate-related response on human peripheral blood mononuclear cells may be modulated by the Ala16Val-SOD2 gene polymorphism. *PLoS One*, 20, e107299. doi: 10.1371/journal.pone.0107299
- Bica, C.G., de Moura da Silva, L.L., Toscani, N.V., da Cruz, I.B., Sá, G., Graudenz, M.S., Zettler, C.G. (2009) MnSOD gene polymorphism association with steroid-dependent cancer. *Pathology and Oncology Research*, 15, 19-24. doi: 10.1007/s12253-008-9064-6
- Bresciani, G., Cruz, I.B., de Paz, J.A., Cuevas, M.J., González-Gallego, J. (2013) The MnSOD Ala16Val SNP: relevance to human diseases and interaction with environmental factors. *Free Radical Research*, 47, 781-92. doi: 10.3109/10715762.2013.836275

- Bresciani G, da Cruz IB, González-Gallego J. (2015) Manganese superoxide dismutase and oxidative stress modulation. *Advances in Clinical Chemistry*, 68, 87-130. doi: 10.1016/bs.acc.2014.11.001
- Costa, F., Barbisan, F., Assmann, C.E., Araújo, N.K.F., de Oliveira, A.R., Signori, J.P., Rogalski, F., Bonadiman, B., Fernandes, M.S., da Cruz, I.B.M. (2016) Seminal cell-free DNA levels measured by PicoGreen fluorochrome are associated with sperm fertility criteria. *Zygote*. (In press)
- Dos Santos Montagner, G.F., Sagrillo, M., Machado, M.M., Almeida, R.C., Mostardeiro, C.P., Duarte, M.M., Cruz, I.B.M. (2010) Toxicological effects of ultraviolet radiation on lymphocyte cells with different manganese superoxide dismutase Ala16Val polymorphism genotypes. *Toxicology In Vitro*, 1410-16. doi: 10.1016/j.tiv.2010.04.010
- Fridovich I. (1995) Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annual Review of Biochemistry*, 64, 97-112. doi: 10.1146/annurev.bi.64.070195.000525
- Gavriliouk, D., Aitken, R.J. (2015) Damage to sperm DNA mediated by reactive oxygen species: its impact on human reproduction and the health trajectory of offspring. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 868, 23-47. doi: 10.1007/978-3-319-18881-2_2
- Halliwell, B., Whiteman, M. (2004) Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *British Journal of Pharmacology*, 142, 231-55. doi: 10.1038/sj.bjp.0705776
- Henkel R. (2007) DNA based sperm assessment. In: Kruger, T. F., van der Spuy, Z., Kempers, R. D. (Eds.). *Advances in Fertility Studies and Reproductive Medicine, IFFS 2007* (pp. 284-289). Cape Town, South Africa.
- Henkel, R., Kierspel, E., Stalf, T., Mehnert, C., Menkyeld, R., Tinnenberg, H.R., Schill, W.B., Kruger, T.F. (2005) Effect of reactive oxygen species produced by spermatozoa and leukocytes on sperm functions in non-leukocytospermic patients. *Fertility and Sterility*, 83, 635-42. doi: 10.1016/j.fertnstert.2004.11.022
- Hsieh, Y.Y., Sun, Y.L., Chang, C.C., Lee, Y.S., Tsai, H.D., Lin, C.S. (2002) Superoxide dismutase activities of spermatozoa and seminal plasma are not correlated with male infertility. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 16, 127-31. doi: 10.1002/jcla.10029
- Iommiello, V.M., Albani, E., Di Rosa, A., Marras, A., Menduni, F., Morreale, G., Levi, S.L., Pisano, B., Levi-Setti, P.E. (2015) Ejaculate oxidative stress is related with sperm DNA

- fragmentation and round cells. *International Journal of Endocrinology*, 2015, 1-6. doi: 10.1155/2015/321901
- Jentzsch, A.M., Bachmann, H., Fürst, P., Biesalski, H.K. (1983) Improved analysis of malondialdehyde in human body fluids. *Free Radical Biology and Medicine*, 20, 251-6. doi:10.1016/0891-5849(95)02043-8
- Ji, G., Gu, A., Wang, Y., Huang, C., Hu, F., Zhou, Y., Song, L., Wang, X. (2012) Genetic variants in antioxidant genes are associated with sperm DNA damage and risk of male infertility in a Chinese population. *Free Radical Biology and Medicine*, 52, 775-80. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2011.11.032
- Koppers, A. J., De Iuliis, G. N., Finnie, J. M., McLaughlin, E. A., Aitken, R. J. (2008) Significance of mitochondrial reactive oxygen species in the generation of oxidative stress in spermatozoa. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 93, 3199-207. doi: 10.1210/jc.2007-2616
- Levine, R.L. (1983) Oxidative modification of glutamine synthetase. I. Inactivation is due to loss of one histidine residue. *The Journal of Biological Chemistry*, 258, 11823–11927. Retrieved from: <http://www.jbc.org/content/258/19/11823.long>
- Macanovic, B., Vucetic, M., Jankovic, A., Stancic, A., Buzadzic, B., Garalejic, E., Korac, A., Korac, B., Otasevic, V. (2015) Correlation between sperm parameters and protein expression of antioxidative defense enzymes in seminal plasma: a pilot study. *Disease Markers*, 2015, 1-5. doi: 10.1155/2015/436236
- Montano, M.A., Barrio Lera, J.P., Gottlieb, M.G., Schwanke, C.H., da Rocha, M.I., Cruz, I.B.M. (2009) Association between manganese superoxide dismutase (MnSOD) gene polymorphism and elderly obesity. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 328, 33-40. doi: 10.1007/s11010-009-0071-z
- Murawski, M., Saczko, J., Marcinkowska, A., Chwilkowska, A., Grybos, M., Banas, T. (2007) Evaluation of superoxide dismutase activity and its impact on semen quality parameters of infertile men. *Folia Histochemica et Cytobiologica*, 45, 123-6. Retrieved from: https://journals.viamedica.pl/fovia_histochemica_cytobiologica/article/view/4471
- Opuwari, C.S., Henkel R.R. (2016). An update on Oxidative damage to spermatozoa and oocytes. *BioMed Research International*, 2016, 1-11. doi: 10.1155/2016/9540142

- Ruiz-Sanz, J.I., Aurrekoetxea, I., Matorras, R., Ruiz-Larrea, M.B. (2011) Ala16Val SOD2 polymorphism is associated with higher pregnancy rates in in vitro fertilization cycles. *Fertility and Sterility*, 95, 1601-5. doi: 10.1016/j.fertnstert.2010.11.022
- Sanocka, D., Miesel, R., Jedrzejczak, P., Chełmonska-Soyta, A.C., Kurpisz, M. (1997) Effect of reactive oxygen species and the activity of antioxidant systems on human semen; association with male infertility. *International Journal of Andrology*, 20, 255-64. doi: 10.1046/j.1365-2605.1997.00050.x
- Shamsi, M.B., Venkatesh, S., Kumar, R., Gupta, N.P., Malhotra, N., Singh, N., Mittal, S., Arora, S., Arya, D.S., Talwar, P., Sharma, R.K., Dada, R. (2010) Antioxidant levels in blood and seminal plasma and their impact on sperm parameters in infertile men. *Indian Journal of Biochemistry and Biophysics*, 47, 38-43. Retrieved from: <http://nopr.niscair.res.in/handle/123456789/7468>
- Shiva, M., Gautam, A.K., Verma, Y., Shivgotra, V., Doshi, H., Kumar, S. (2011) Association between sperm quality, oxidative stress, and seminal antioxidant activity. *Clinical Biochemistry*, 44, 319-24. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2010.11.009
- Taufer, M., Peres, A., de Andrade, V.M., de Oliveira, G., Sá, G., do Canto, M.E., dos Santos, A.R., Bauer, M.E., da Cruz, I.B. (2005) Is the Val16Ala manganese superoxide dismutase polymorphism associated with the aging process? *The Journals of Gerontology. Series A, Biological Sciences and Medical Sciences*, 60, 432-438. doi: 10.1093/gerona/60.4.432
- Uribe, P., Boguen, R., Treulen, F., Sánchez, R., Villegas, J.V. (2015) Peroxynitrite-mediated nitrosative stress decreases motility and mitochondrial membrane potential in human spermatozoa. *Molecular Human Reproduction*, 21, 237-43. doi: 10.1093/molehr/gau107
- Wdowiak, A., Bakalczuk, S., Bakalczuk, G. (2015) Decreased activity of superoxide dismutase in the seminal plasma of infertile men correlates with increased sperm deoxyribonucleic acid fragmentation during the first hours after sperm donation. *Andrology*, 3, 748-755. doi: 10.1111/andr.12061
- Yan, G., Xie, X., Wang, Y., Shi, L., Zhou, W., Liu, Y., Tong, X., Ji, Y. (2015) Twin pregnancy after intracytoplasmic sperm injection in woman aged 49 using autologous oocytes by mild ovarian stimulation: a case report. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, 15, 1707-9. Retrieved from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4723976/>

Yan, L., Liu, J., Wu, S., Zhang, S., Ji, G., Gu, A. (2014) Seminal superoxide dismutase activity and its relationship with semen quality and SOD gene polymorphism. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 31, 549-54. doi: 10.1007/s10815-014-0215-2

4- DISCUSSÃO

Diversos estudos vêm destacando o papel central do estresse oxidativo sobre a etiologia de danos no DNA, inclusive sobre os gametas masculinos (SWARUP e RAJESWARI, 2007; ZHU et al., 2005). Estudos prévios mostram que danos de DNA parecem ter influência sobre a fertilidade masculina, afetando principalmente a viabilidade dos espermatozoides (AOKI et al., 2006 ; SIMON et al., 2011; NI et al., 2014).

Por esta razão, considerar que somente a avaliação microscópica dos espermatozoides, através da análise de fatores como a concentração, a motilidade e morfologia pode ser insuficiente para o diagnóstico da infertilidade masculina. Pois, ainda não foi esclarecida a forma como os parâmetros utilizados para determinar a fertilidade através de análises microscópicas estariam relacionados a alterações causadas pelo estresse oxidativo (NI et al., 2016).

Assim, buscamos realizar estudos que pudessem relacionar parâmetros do estresse oxidativo com os parâmetros analisados pelo espermograma. O conjunto dos nossos resultados demonstrou que o ensaio DNA Picogreen pode ser utilizado para a quantificação de DNA livre no plasma seminal (cfDNA). Levando em consideração os parâmetros de fertilidade considerados pela OMS e níveis elevados de cfDNA, verificamos associação com pelo menos uma das variáveis de estresse oxidativo avaliadas.

Nossos resultados corroboram o estudo de LI e colaboradores (2009), no qual os autores descrevem associação de cfDNA e normozoospermia ou azoospermia através da análise por quantificação via PCR em tempo real e eletroforese. Na detecção por PCR concentrações de cfDNA de $1,34 \pm 0,65 \mu\text{g/mL}$ estavam associadas a normozoospermia e concentrações mais elevadas $2,56 \pm 1,43 \text{ ng/mL}$ relacionadas a azoospermia . Apesar da elevada especificidade da técnica de PCR utilizado por estes autores, esta é uma técnica inviável para a maioria dos laboratórios de análises clínicas, devido ao elevado custo dos reagentes, dos equipamentos e da necessidade de pessoal altamente treinado para realizar tal teste. Já a utilização de um método de quantificação de DNA utilizando um reagente de fluorescência, tal como a solução com corante Picogreen, seria mais facilmente incorporada à rotina laboratorial, uma vez que esta é uma técnica facilmente executável e de baixo custo.

Nosso primeiro estudo investigou amostras de sêmen obtidas a partir de pacientes masculinos submetidos a análises de esperma em Laboratório Clínico, sendo utilizado neste estudo material que seria descartado. Para testar a potencial associação entre os parâmetros de

fertilidade determinados pela OMS e as variáveis de estresse oxidativo, optamos por analisar somente o plasma seminal, por esta ser uma análise que reflete as condições do microambiente, em que os espermatozoides estão inseridos. Ainda, o plasma seminal é mais facilmente analisado, pois não há a necessidade de procedimentos adicionais, tais como a ruptura da membrana do esperma para acessar o conteúdo interno das células, o que aumenta a complexidade e o custo da avaliação, se considerarmos a possível incorporação destes testes bioquímicos à análise do espermograma tradicional.

Foram realizadas análises complementares no protocolo *in vitro* buscando confirmar a associação entre os níveis de cfDNA, estresse oxidativo no esperma e viabilidade. Sendo realizados os testes TBARS para análise da lipoperoxidação, ROS – (DCFH-DA), que visa quantificar a produção de espécies reativas de oxigênio, e a Carbonilação de proteínas que busca avaliar danos causados pelo estresse oxidativo em proteínas. Nossos resultados mostraram que a avaliação dos níveis de cfDNA reflete a viabilidade do esperma, bem como o estado de estresse oxidativo.

Jamalan e colaboradores (2016), realizaram estudo em que o esperma foi submetido a tratamento com metais tóxicos indutores de estresse oxidativo e flavonoides com capacidade antioxidante. Os resultados demonstraram que a exposição aos metais diminuiu a motilidade dos espermatozoides, e aumentou os níveis de lipoperoxidação. O tratamento com os flavonoides atenuou os efeitos negativos dos metais sobre a motilidade espermática e foi capaz de diminuir os níveis de malondialdeído. Demonstrou-se assim, que o estresse oxidativo está diretamente relacionado com a motilidade dos espermatozoides, e, conseqüentemente, com a fertilidade.

Considerando estudos anteriores que sugeriram uma potencial influência do Val16Ala-SOD2 SNP sobre a fertilidade masculina, realizamos a extração do DNA e a determinação do genótipo (ZHANG et al, 2014; CADONA et al, 2014). Nossos resultados mostraram uma associação entre o genótipo VV e pelo menos um critério de fertilidade alterado, mas não com um critério específico. Este resultado não foi consistente com os de Yan et al., (2014) que relataram uma associação entre o genótipo AA e infertilidade masculina em chineses. No entanto, ambos os genótipos homozigóticos parecem causar desequilíbrio oxidativo e são influenciados por outras variáveis de estilo de vida como dieta (CADONA et al., 2014), e, portanto, esta aparente controvérsia não é crucial.

Por outro lado, os nossos resultados são consistentes com os relatados por Iommiello et al., (2015) em que demonstra uma associação entre o estresse oxidativo causado pela presença de ânions superóxido, fragmentação do DNA do esperma e altas concentrações de células redondas. Neste estudo nós não fomos capazes de determinar os níveis de ânion superóxido (devido a limitações de volume de plasma seminal para executar esta e as análises complementares). Nossos resultados mostraram uma associação entre os níveis elevados de lipoperoxidação e todos os parâmetros de fertilidade avaliados no espermograma. Os efeitos negativos de níveis elevados de ânion superóxido foram confirmados no protocolo *in vitro* realizado nesta investigação.

Esta associação pode refletir um desequilíbrio do ânion superóxido que, em níveis elevados podem reagir com o óxido nítrico e levar a produção de peroxinitrito, uma importante espécie reativa de nitrogênio. O estresse nitrosativo provoca nitração e oxidação de lipídios, proteínas e DNA, sendo um importante mecanismo patogênico relacionado ao aparecimento de várias doenças. Uma investigação recentemente executada por Uribe et al., (2015) , expôs espermatozoides humanos provenientes de doadores saudáveis a linsidomina, uma substância geradora de peroxinitrito por 4 horas. Os resultados demonstraram que o sêmen exposto a linsidomina apresentou diminuição da motilidade progressiva ou total e do potencial de membrana mitocondrial. Os autores sugerem que o estresse nitrosativo induzido por peroxinitrito prejudica as funções vitais do gameta masculino, possivelmente contribuindo para a infertilidade masculina.

Uma associação independente entre níveis elevados de carbonilação de proteínas e morfologia alterada dos espermatozoides foi encontrada neste estudo. Esses resultados corroboram os resultados anteriores que descrevem uma associação significativa entre maiores níveis de carbonilação de proteínas e espermatozoides com morfologia alterada (SHIVAET al., 2011). Já níveis de ROS mais elevados foram independentemente associados com uma maior frequência de leucócitos.

Um potencial novo marcador de fertilidade apresentado nesta tese é a quantificação de cfDNA. Em células viáveis o DNA está contido no núcleo da célula, portanto, a detecção de fragmentos de cfDNA no sangue ou no plasma seminal pode refletir ocorrência de morte celular.

Neste trabalho, a avaliação dos níveis de cfDNA, foi o marcador que apresentou uma associação independente com múltiplas variáveis consideradas no espermograma (baixa viabilidade e alterações da motilidade e morfologia). Vale ressaltar, que este é o primeiro

trabalho relatando uma associação entre os níveis de cfDNA livre e alterações espermáticas que possam afetar a fertilidade.

O desequilíbrio entre os níveis de superóxido e peróxido de hidrogênio pode causar estresse oxidativo que é capaz de afetar a qualidade seminal. Esta condição poderia estar associada à questão genética, sendo afetada por polimorfismos como é o caso do Val16Ala-SOD2. Este polimorfismo é capaz de afetar os níveis da enzima SOD2, afetando diretamente o equilíbrio entre a produção e detoxificação do ânion radical superóxido e do peróxido de hidrogênio.

Por esta razão foi realizado um estudo para avaliar a associação potencial entre Val16Ala-SOD2 e os parâmetros de fertilidade do sêmen recomendando pela OMS.

Os resultados mostraram que os homens de genótipo heterozigótico (AV) apresentaram parâmetros de fertilidade melhores do que das amostras provenientes de indivíduos homozigóticos (VV e AA).

Ji e colaboradores (2012), testaram a hipótese de que polimorfismos em genes de enzimas antioxidantes poderiam ocasionar maior suscetibilidade a danos de DNA no esperma e consequentemente infertilidade masculina. Os autores avaliaram seis polimorfismos correspondentes as enzimas antioxidantes e dentre eles o Val16Ala-SOD2, em 580 chineses com infertilidade e 580 controles férteis. Os resultados indicaram que o polimorfismo Val16Ala está associado com um risco significativamente maior de infertilidade masculina, fragmentação do DNA espermático e valores aumentados de 8 deoxiguanosina, um marcador de lesões oxidativas no DNA. Os autores concluíram que os dados sugerem que as variações genéticas em genes antioxidantes podem contribuir para lesões oxidativas no DNA dos espermatozoides e infertilidade masculina.

No entanto, o estudo (JI et al., 2012) constatou associação entre o genótipo AA e marcadores de infertilidade no esperma. Na verdade, os autores postularam que uma maior eficiência SOD2 associada ao genótipo AA poderia representar um fator de proteção contra dano oxidativo dos espermatozóides. Contudo, esse resultado parece contraditório, uma vez que está bem estabelecido por outras investigações que ambos os genótipos homozigotos SOD2 poderiam contribuir para o desequilíbrio entre espécies reativas e assim levar ao estabelecimento do estresse oxidativo e consequentemente o surgimento de doenças (DAL BERTO et al., 2015; BRESCIANI et al., 2015).

Neste contexto, nossos resultados que apontam associação de ambos os genótipos homocigóticos com infertilidade têm plausibilidade biológica. Uma vez que níveis basais de superóxido mais elevados estão associados com o genótipo VV. O superóxido poderia reagir com o óxido nítrico que é produzido por praticamente todas as células, resultando em concentrações mais altas de peroxinitrito, e subsequentemente pode causar grande lipoperoxidação nas células. Por outro lado, altos níveis de peróxido de hidrogênio, condição associada ao genótipo AA, poderia reagir com íons metálicos, como o ferro, no citoplasma gerando radical hidroxila. Esta espécie reativa tem alta afinidade ao DNA, com capacidade de causar danos extensos nesta molécula.

O resultado diferenciado entre a população chinesa e brasileira poderia se explicar pela origem étnica substancialmente diferente, em que possa haver alguns fatores de proteção étnica ou de estilo de vida que atenuaram o risco de danos do genótipo VV sobre a viabilidade de espermatozoides na população chinesa. Apesar desta diferença, os resultados encontrados aqui corroboram o estudo chinês, pois em ambos os estudos foi encontrada a associação entre o polimorfismo SOD2 e os parâmetros de fertilidade do espermatozoide.

Uma investigação complementar em homens chineses executados por Yan et al (2014) mostrou associação entre o genótipo AA e menor atividade SOD. No entanto, esses autores observaram alta influência do padrão alimentar antioxidante nos resultados, sendo que a ingestão de vitamina C foi capaz de aumentar significativamente os níveis da SOD. Um resultado tão inesperado poderia ser explicado pelo padrão alimentar desta população, uma vez que biologicamente este é um resultado bastante inesperado.

A associação independente entre os parâmetros de fertilidade do sêmen e marcadores de oxidação encontrados aqui não é um resultado novo. Vários estudos têm relatado um impacto negativo de marcadores de estresse oxidativo e a função espermática (JI ET AL., 2012; YAN et al., 2014). No entanto, a contribuição potencial do polimorfismo Val16Ala-SOD2, no aumento de marcadores de oxidação ainda havia sido estudado.

Como já citado em nosso estudo, os genótipos homocigóticos AA e VV apresentaram níveis de lipoperoxidação mais altos que o heterocigótico AV, indicando um desequilíbrio oxidativo basal potencialmente associado com maior número de parâmetros de fertilidade alterados no sêmen. Estes resultados estão de acordo com estudos que indicam efeitos negativos do desequilíbrio oxidativo Superóxido-Peróxido de hidrogênio associado com genótipos

homozigóticos SOD2 publicados na literatura (AZZOLIN et al., 2016; BRESCIANI et al., 2015; BARBISAN et al., 2014). Uma investigação realizada por Ruiz-Sanset al 2010, avaliou a associação entre Val16Ala-SOD2 com a infertilidade e gravidez *in vitro* por ciclos de fertilização. Os autores concluíram que o genótipo AA foi um preditor independente de ocorrência de gravidez na fertilização *in vitro*.

No entanto, é válido comentar, que a maioria das investigações sugere associação de algum risco com um genótipo ou outro, não com ambos os genótipos como foi encontrado em nosso estudo.

Entretanto, devido à alta sensibilidade das células de esperma ao desequilíbrio oxidativo que ocorre principalmente nos genótipos homozigóticos (VV e AA). Um indivíduo que carrega o genótipo heterozigótico (AV), teoricamente, teria um equilíbrio basal nos níveis de superóxido e peróxido de hidrogênio, apresentando assim menor propensão genética ao estresse oxidativo, assim o genótipo AV poderia ser vantajoso.

Apesar das limitações metodológicas do nosso desenho do estudo, incluindo a falta de informações em relação ao estilo de vida e de saúde dos doadores na ocasião em que foram obtidas amostras de sêmen, os resultados sugerem que os parâmetros tradicionais de fertilidade do esperma refletem a presença de estresse oxidativo. Outra consideração importante de nossos resultados é que as diferentes variáveis oxidativas analisadas estão independentemente associadas com diferentes parâmetros da fertilidade do sêmen.

Fatores endógenos e exógenos que contribuem para o estresse oxidativo estão envolvidos na infertilidade e, em muitos casos, são facilmente modificáveis. Os antioxidantes desempenham um papel protetor, embora um delicado equilíbrio de redução e oxidação é necessário para a função espermática essencial, incluindo a fertilização. Lynch e colaboradores (2014) demonstraram que o estresse oxidativo aumenta o risco de infertilidade em mulheres. Assim, reduzir o estresse oxidativo pode melhorar as chances de um casal de conceber uma criança, naturalmente ou através de tratamentos de reprodução assistida. Fontes de estresse oxidativo, portanto, devem ser cuidadosamente examinados em homens com altos níveis de fragmentação do DNA e modificados sempre que possível.

5- CONCLUSÃO

A partir dos resultados desse estudo é possível concluir e considerar que há uma correlação positiva entre níveis elevados de cfDNA no plasma seminal e alterações em parâmetros de qualidade espermáticas, com conseqüente relação entre os níveis de cfDNA e infertilidade masculina. O desbalanço superóxido-peróxido de hidrogênio tanto induzido geneticamente pelo polimorfismo Val16Ala-SOD2 quanto pela exposição de espermatozoides ao paraquat demonstrou relação com uma menor qualidade espermática. Uma vez que os resultados demonstraram associação entre os genótipos homozigóticos AA e VV com marcadores do estresse oxidativo e menor qualidade espermática com queda na motilidade dos espermatozoides.

Os resultados encontrados aqui podem ser relevantes para o êxito de técnicas de reprodução assistida, uma vez que o sucesso destes procedimentos pode ser influenciado pelo estresse oxidativo, que por sua vez, está relacionado com o dano do DNA espermático.

Assim a avaliação de parâmetros oxidativos pode ser de grande relevância na escolha de qual procedimento a ser utilizado na fertilização *in vitro*. Assim, a utilização da técnica DNA Picogreen, como um marcador complementar aos parâmetros de fertilidade atualmente utilizados, pode contribuir para tratamentos mais eficazes e realistas.

REFERÊNCIAS

AGARWAL, A.; SALEH, R. A. Role of oxidants in male infertility: rationale, significance and treatment. **Urol. Clin. North Am.**, v.29, n.4, p. 817-827, 2002.

AGARWAL, A. et al. The effect os sperm DNA damage on assisted reproduction outcomes. A review. **Minerva Ginecol.**, v. 56, p.235-245, 2004.

AGARWAL, A. et al. Role of antioxidants in treatment of male infertility: an overview of the literature. **Reprod. biomed. Online**, v. 8, n.6, p. 616-627, 2004.

AGARWAL, A. et al. Effect of oxidative stress on male reproduction. **World J. Mens Health.**, v.32, n.1,p.1-17, 2014.

AGARWAL, A. et al. Oxidation-reduction potential of semen: what is its role in the treatment of male infertility? **Ther. Adv. Urol.**, v.8, p.302-308, 2016.

AITKEN, R.J.; KOOPMAN, P.; LEWIS, S.E. Seeds of concern. **Nature**, v. 432, p.48-52, 2004.

AITKEN, R.J. et al. Oxidative stress and male reproductive health. **Asian J. Androl.**, v.16, n. 1, p. 31-8, 2014.

AITKEN, R. J. et al. Analysis of the effects of polyphenols on human spermatozoa reveals unexpected impacts on mitochondrial membrane potential, oxidative stress and DNA integrity; implications for assisted reproductive technology. **Biochem. Pharmacol.**, v. 19, 2016 .

AMBROSONE, C. B. et al. Manganese superoxide dismutase (MnSOD) genetic polymorphisms, dietary antioxidants, and risk of breast cancer. **Cancer Res.**, v. 59, p. 602-606, 1999.

AOKI, V.W.; LIU, L.; CARRELL, D.T. A novel mechanism of protamine expression deregulation highlighted by abnormal protamine transcript retention in infertile human males with sperm protamine deficiency. **Mol. Hum. Reprod.**, v. 12, p.41-50, 2006.

AZZOLIN, V. F. et al. Superoxide-hydrogen peroxide imbalance interferes with colorectal cancer cells viability, proliferation and oxaliplatin response. **Toxicol. In Vitro.**, v. 32, p.8-15, 2016.

BACCETTI, B.; COLLODEL, G.; PIOMBONI, P. Apoptosis in human ejaculated sperm cells. **J. Submicrosc. Cytol. Pathol.**, v. 28, p. 587-596, 1996.

BAKER M. A.; AITKEN R. J. Reactive oxygen species in spermatozoa: methods for monitoring and significance for the origins of genetic disease and infertility. **Reprod Biol Endocrinol.**, v.3, p.67-74, 2005.

- BANSAL A. Impacts of oxidative stress and antioxidants on semen functions. **Vet. Med. Inter.**, p.1-7, 2011.
- BARBISAN, F. et al. Methotrexate-related response on human peripheral blood mononuclear cells may be modulated by the Ala16Val-SOD2 gene polymorphism. **Plos One.**, v.9, 2014.
- BARRATT, C. L. et al. Sperm DNA: organization, protection and vulnerability: from basic science to clinical applications—a position report. **Hum. Reprod.**, v.25, p.824–838, 2010.
- BARROSO, G. et al. Developmental sperm contributions: fertilization and beyond. **Fertil Steril.**, v.92, p.835–848, 2009.
- BERTO, M. et al. The effect of superoxide anion and hydrogen peroxide imbalance on prostate cancer: an integrative in vivo and in vitro analysis. **Med. Oncol.**, v. 32, p. 251-255, 2015.
- BICA, C. et al. MnSOD Gene Polymorphism Association with Steroid-Dependent Cancer. **Pathol. Oncol. Res.**, v. 15, p. 19-24, 2009.
- BICA, C. et al. Association of manganese superoxide dismutase gene polymorphism (Ala-9Val) and breast cancer in males and females. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, v. 43, n. 3, p. 219-225, 2007.
- Bionline, Universidade Federal de Santa Maria. Ivana Beatrice Manica da Cruz. <<http://www.bionline-ufsm.com/aulas-embriologia>>. Acesso em: 10 set. 2016.
- BOIVIN, J. et al. International estimates of infertility prevalence and treatment-seeking: potential need and demand for infertility medical care. **Hum Reprod.**, v. 22, p.1506–1512, 2007.
- BORINI, A. et al. Sperm DNA fragmentation: paternal effect on early post-implantation embryo development in ART. **Hum. Reprod.**, v.21, p.2876–2881, 2006.
- BRESCIANI, G. et al. The Val16Ala MnSOD gene polymorphism modulates oxidative response to exercise. **Clin Biochem.**, v.46, n.4-5, p.335-40, 2013.
- BUSTAMANTE FILHO, I.C.; SILVA, J.F.S.; JOBIM, M.I.M. Apoptosis in spermatozoa: a new approach in sperm viability evaluation. **Sem. Ciênc. Agr.** v.26, n.3, 2005.
- CADONA, F.C. et al. Genomodifier capacity assay: a non-cell test using dsDNA molecules to evaluate the genotoxic/genoprotective properties of chemical compounds. **Anal. Methods.**, v.6, p.8559-8568, 2014.
- CARRELL, D. T. et al. Sperm DNA fragmentation is increased in couples with unexplained recurrent pregnancy loss. **Arch. Androl.**, v.49, p.49–55, 2003.
- CHOI, W.S. et al. The regulatory effect of veratric acid on NO production in LPS-stimulated RAW264.7 macrophage cells. **Cell Immunol.**, v. 280, n.2, p. 164-170, 2012.

CHI, H.J. et al., Integrity of human sperm DNA assessed by the neutral comet assay and its relationship to semen parameters and clinical outcomes for the IVF-ET program. **Clin. Exp. Reprod. Med.**, v.38, p. 10-17, 2011.

COOPER, T.G. et al. World Health Organization reference values for human semen characteristics. **Hum. Reprod. Update**, v.16, n.3, p.321-345, 2010.

COSTA, F. et al. Influence of Val16Ala SOD2 polymorphism on the in-vitro effect of clomiphene citrate in oxidative metabolism. **Reprod. BioMed. Online**, v.24, p.474– 481, 2012.

DE LAMIRANDE, E.; GAGNON, C. Human sperm hyperactivation and capacitation as parts of an oxidative process. **Free Radic. Biol. Med.**, v.14, p.157–166; 1993.

DONNELLY, E.T. et al. Differences in nuclear DNA fragmentation and mitochondrial integrity of semen and prepared human spermatozoa. **Hum. Reprod.**, v.15, p.1552-1561, 2000.

DONNELLY, E.T. et al. Assessment of DNA integrity and morphology of ejaculated spermatozoa from fertile and infertile men before and after cryopreservation. **Hum Reprod.**, v.16, p.1191-1199, 2001.

DUARTE, M. M. et al. Oxidative stress in hypercholesterolemia and its association with Val16Ala superoxide dismutase gene polymorphism. **Clin. Bioch.**, v. 43, n. 13-14, p. 1118-1123, 2010.

ESTEVEZ, S.C.; MIYAOKA, R.; AGARWAL, A. Na uptake on the clinical assessment of the infertile male. **Clinics**, v. 66, n.4, p. 691-700, 2011.

ESTEVEZ, S.C. et al. Critical appraisal of world health organization's new reference values for human semen characteristics and effect on diagnosis and treatment of subfertile men. **Urol.** v.70, n.1, p.16-22, 2012.

FARIELLO, R.M. et al. Effect of leukocytospermia and processing by discontinuous density gradient on sperm nuclear DNA fragmentation and mitochondrial activity. **J.Assist.Reprod. Genet.**, v. 26, p.151-7, 2009.

FORSBERG, L.; DE FAIRE, U.; MORGENSTERN, R. Oxidative stress, human genetic variation, and disease. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 389, p.84–93, 2001.

FUJIMOTO, H.; TAGUCHI, J. I.; IMAI, Y. Manganese superoxide dismutase polymorphism affects the oxidized low-density lipoprotein- induced apoptosis of macrophages and coronary artery disease. **Eur. Heart J.**, n. 649, p. 1-6, 2008.

GOTTLIEB, M. G.; SCHWANKE, C. H.; SANTOS, A. F. Association among oxidized LDL levels, SOD2, apolipoprotein E polymorphisms, and cardiovascular risk factors in a south Brazilian region population. **Genet. Mol. Res.**, n. 4, p. 691-703, 2005.

GNOTH, C. et al. Definition and prevalence of subfertility and infertility. **Hum. Reprod.**, n. 20, n.5, p.:1144-1147, 2005.

HONORÉ P, HANTSON PH, FAUVILLE JPH, PEETERS A, MAHIEU P: Paraquat poisoning: State of the Art. **Acta Clinica Belgica**. p.49-555, 1994.

JAMALAN, M. et al. Human Sperm Quality and Metal Toxicants: Protective Effects of some Flavonoids on Male Reproductive Function. **Int. J. Fertil. Steril.**,v.10, p.215-223, 2016.

Ji, G. et al. Genetic variants in antioxidant genes are associated with sperm DNA damage and risk of male infertility in a Chinese population. **Free Rad. Biol. Med.**, n. 52, p.775–780, 2012.

JOHNSON, P. Antioxidant enzyme expression in health and disease: effects of exercise and hypertension. **Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.**, n. 133, p. 493-505, 2002.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 10. ed. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan S.A. , 2004.

KAKKO, S.; PAIVANSALO, M.; KOISTINEN, P. The signal sequence polymorphism of the SOD2 gene is associated with the degree of carotid atherosclerosis. **Atheroscl.**, n. 168, p. 147-152, 2003.

LANDI, S. et al. Polymorphisms of glutathione-S-transferase M1 and manganese superoxide dismutase are associated with the risk of malignant pleural mesothelioma. **Int. J. Cancer**, v. 120, p.2739–2743, 2007.

LANE, M. et al. Oxidative stress in mouse sperm impairs embryo development, fetal growth and alters adiposity and glucose regulation in female offspring. **PLoS one**, 9(7):e 100832, 2014.

LEWIS, S. E.; AITKEN, R. J. DNA damage to spermatozoa has impacts on fertilization and pregnancy. **Cell Tissue Res**. v.322, 33–41, 2005.

LEWIS, S. E.; SIMON L. Clinical implications of sperm DNA damage. **Hum. Fertil.(Camb)**. v.13, n.4, p.201-207, 2010.

LOFT, S. et al. Oxidative DNA damage in human sperm influences time to pregnancy. **Hum Reprod**. v.18, p.1265–72, 2003.

LOMMIELLO, V.M. et al. Ejaculate oxidative stress is related with sperm DNA fragmentation and round cells. **Int. J. Endocrinol.**, v.34, p. 324-330, 2015.

LI, Y. et al. Dilated cardiomyopathy and neonatal lethality in mutant mice lacking manganese superoxide dismutase. **Nature Genet.**, v.11, p.376-381, 1995.

LYNCH, K. E. et al. Assessment of anovulation in eumenorrheic women: comparison of ovulation detection algorithms. **Fertil. Steril.**, v.102, p.511-518, 2014.

MAKUCH, M.Y. et al. Inequitable access to assisted reproductive technology for the low-income Brazilian population: a qualitative study. **Hum. Reprod.** v.26, n.8, p.2054-2060, 2011.

MELLO, A.P. et al. Electronegative low-density lipoprotein: origin and impact on health and disease. **Atheroscl.**, v.215, p. 257-265, 2011.

MOORE, K.L.; PERSAUD, T. V. N. ; TORCHIA, M. G. **Embriologia Básica**. 8ª. ed. Elsevier, 2013

MORABITO C. et al. Modulation of redox status and calcium handling by extremely low frequency electromagnetic fields in C2C12 muscle cells: A real-time, single-cell approach. **Free Rad. Biol. Med.** v. 48, p. 579–589, 2010.

MORRIS, I.D. et al. The spectrum of DNA damage in human sperm assessed by single cell gel electrophoresis (Comet assay) and its relationship to fertilization and embryo development. **Hum. Reprod.**, v.17, p.990-998, 2002.

MONTAGNER , G. et al. Toxicological effects of ultraviolet radiation on lymphocyte cells with different manganese superoxide dismutase Val16Ala polymorphism genotypes. **Toxicol In Vitro**, v. 24, n.5, p.1410-1416, 2010.

PARRA , F. C. et al. Color and genomic ancestry in Brazilians. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v.100, p.177-182, 2003.

PAASCH, U. et al. Activation pattern of caspases in human spermatozoa. **Fertil. Steril.**, v. 81, p.802-809, 2004.

ROTA, C.; CHIGNELL, C. F.; MASON, R. P. Evidence for free radical formation during the oxidation of 2'-7'-dichlorofluorescein to the fluorescent dye 2'-7'-dichlorofluorescein by horseradish peroxidase: possible implications for oxidative stress measurements. **Free Rad. Biol. Med.**, v. 27, n. 7-8, p. 873-881,1999.

RUIZ-SANZ, J. I. et al. Val16Ala SOD2 polymorphism is associated with higher pregnancy rates in in vitro fertilization cycles. **Fert. Steril.**, n. 95, p. 1601-1605, 2011.

SADLER, T.W. **Langman - Embriologia Médica**. 13 ed. Rio de Janeiro, ED. Guanabara Koogan, 2016.

SALEH, R.A. et al. Negative effects of increased sperm DNA damage in relation to seminal oxidative stress in men with idiopathic and male factor infertility. **Fertil. Steril.** v.79, p. 1597-1605, 2003.

SAID, T. M. et al. Clinical consequences of oxidative stress in male infertility. *Studies on Men's Health and Fertility. Oxidat. Stress in Appl. Basic Res. Clin. Prat.* v.12, p. 535-549, 2012.

SCHMIDT, T.E. et al. Genetic damage in oligozoospermic patients detected by fluorescence in-situ hybridization, inverse restriction site mutation assay, sperm chromatin structure assay and the Comet assay. *Hum. Reprod.* v.18, p.1474-1480, 2003.

SCHUFFNER, A. **Associação entre concentração, motilidade e morfologia de espermatozoides humanos e a porcentagem de Apoptose e Peroxidação Lipídica antes e após o seu congelamento.** 2008.45p. Dissertação (Mestrado em Medicina Interna)- Universidade Federal do Paraná, Curitiba -PR, 2008.

SCHUFFNER, A, et al. Programed cell death and lipid peroxidation in human spermatozoa. *Femina*, v. 37, n. 6, 2009.

SERRA, A.; DOMINGOS, F.; PRATA, M. M. Intoxicação por Paraquat. *Acta Médica Portuguesa.*v. 16, p. 25-32, 2003.

SHAMSI, M.B. et al. DNA integrity and semen quality in men with low seminal antioxidant levels. *Mutat. Res.*, v.665, p.29-36, 2009.

SHEENA, E. M. ; LEWIS, S.; SIMON, L. Clinical implications of sperm DNA damage. *Hum. Fertil.*v.13, n.4, p.201-207, 2010.

SHIMODA-MATSUBAYASHI, S. et al. Structural dimorphism in the mitochondrial targeting sequence in the human manganese superoxide dismutase gene. *Bioch. Bioph. Res. Commun.*, n. 226, p. 561-565, 1996.

SLANGER, T. E.; CHANG-CLAUDE, J.; WANG-GOHRKE, S. Manganese superoxide dismutase Ala-9Val polymorphism, environmental modifiers, and risk of breast cancer in a German population. *Cancer Causes Control.*, n. 17, p. 1025-1031, 2006.

SIMON, L. et al. Relationships between human sperm protamines, DNA damage and assisted reproduction outcomes. *Reprod. Biomed. Online.*, v. 23, n.6, p. 724-734, 2011.

SUTTON, A.; KHOURY, H.; PRIP-BUUS, C. The Val16Ala genetic dimorphism modulates the import of human manganese superoxide dismutase into rat liver mitochondria. *Pharmacogenet.* n. 13, p. 145-157, 2003.

TAMIMI, R. et al. Manganese superoxide dismutase polymorphism, plasma antioxidants, cigarette smoking, and risk of breast cancer. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.*, v. 13, p. 989-996, 2004.

TAUFER, M. et al. Is the Val16Ala manganese superoxide dismutase polymorphism associated with the aging process? **J Gerontol A Biol Sci Med Sci.**, v. 60, n. 4, p. 432-438, 2005.

TESARIK, J.; MENDOZA-TESARIK, R.; MENDOZA, C. Sperm nuclear DNA damage: update on the mechanism, diagnosis and treatment. **Reprod. Biomed. Online.**, v.12, p.715-721, 2006.

TOMSU, M. et al. Embryo quality and IVF treatment outcomes may correlate with different sperm comet assay parameters. **Hum. Reprod.** v.17, p.1856-1862, 2002.

TRISINI, A.T. et al. Relationship between human semen parameters and deoxyribonucleic acid damage assessed by the neutral comet assay. **Fertil. Steril.**, v.82, p.1623-1632, 2004.

WANG, X. et al. Oxidative stress is associated with increased apoptosis leading to spermatozoa DNA damage in patients with male factor infertility. **Fertil. Steril.**, v. 80, n.3, 2003.

YAN, L. et al. Seminal superoxide dismutase activity and its relationship with semen quality and SOD gene polymorphism. **J. Assisted. Reprod. Genet.**, 31, 549-54, 2014.

ZEJNILOVIC, J. et al. Association between manganese superoxide dismutase polymorphism and risk of lung cancer. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v.189, p.1-4, 2009.

ZELKO, I. N.; MARIANI, T. J.; FOLZ, R. J. Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn- SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. **Free Rad. Biol. Med.**, n. 33, p. 337-349, 2002.

ANEXO 1- COMPROVANTE DE ACEITE DO MANUSCRITO

Zygote - Decision on Manuscript ID ZYG-2015-0095.R3 Entrada x

Zygote <onbehalfof+brian.dale+virgilio.it@manuscriptcentral.com>
para mim ▾

25-Aug-2016

Dear Prof. DA CRUZ:

Thank you for submitting the final version of your manuscript entitled "Seminal cell-free DNA levels measured by PicoGreen fluorochrome are associated with sperm fertility criteria", which is acceptable for publication in the Zygote in its current form.

We will now initiate the Production process and you will receive the proofs in due course.

PLEASE NOTE: Zygote offers authors the option to publish their article through an Open Access model (Cambridge Open Option, see <http://journals.cambridge.org/action/displaySpecialPage?pagelId=4576> for details), on payment of a one-off fee. If you wish to do this, please send an e-mail stating this choice to zygote@cambridge.org and complete and return the alternative copyright transfer and order form which can be accessed by clicking the link below:


http://journals.cambridge.org/images/fileUpload/documents/ZYG_ctf_oa.pdf

If you choose to publish via Open Access, you will be contacted shortly by CCC- Rightslink who are acting on our behalf to collect the Article Processing Charges (APCs). Please follow their instructions in order to avoid any delay in the publication of your article.

Sincerely,
Prof. Brian Dale
Editor-in-Chief, Zygote
brian.dale@virgilio.it

25 de ago ☆

ANEXO 2- COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DO MANUSCRITO 2

Human Fertility	
	
<p>The Val16Ala-SOD2 polymorphism that causes superoxide-hydrogen peroxide imbalance influence some sperm fertility criteria</p>	
Journal:	<i>Human Fertility</i>
Manuscript ID	Draft
Manuscript Type:	Original Manuscripts
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Cruz, Ivana; Federal University of Santa Maria Costa, Felipe; Universidade Federal de Santa Maria Barbisan, Fernanda; Universidade Federal de Santa Maria Assmann, Charles; Universidade Federal de Santa Maria Seehaber, Andressa; Universidade Federal de Santa Maria Mastella, Moises; Universidade Federal de Santa Maria Duarte, Thiago; Universidade Federal de Santa Maria Duarte, Marta; Universidade Luterana do Brasil
Keywords:	fertility, fertility treatment, reactive oxygen species