

UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

INFECÇÃO CAUSADA PELO PAPILOMAVÍRUS HUMANO
E SUA INFLUÊNCIA NA QUALIDADE SEMINAL E NO
ESTRESSE OXIDATIVO

LETÍCIA LUCHESE

Caxias do Sul

2007

LETÍCIA LUCHESE

**INFECÇÃO CAUSADA PELO PAPILOMAVÍRUS HUMANO
E SUA INFLUÊNCIA NA QUALIDADE SEMINAL E NO
ESTRESSE OXIDATIVO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-
graduação em Biotecnologia da Universidade
de Caxias do Sul, visando a obtenção de grau
de Mestre em Biotecnologia.

Orientador:

Prof. Dr. Fábio Firmbach Pasqualotto

Co-Orientadores:

Prof. Dr. Eduardo Pretto Serafini

Prof^ª. Dra. Jovana Mandelli

Colaboradora:

Prof^ª. Dra. Mirian Salvador

Caxias do Sul

2007

LETÍCIA LUCHESE

**INFECÇÃO CAUSADA PELO PAPILOMAVÍRUS HUMANO
E SUA INFLUÊNCIA NA QUALIDADE SEMINAL E NO
ESTRESSE OXIDATIVO**

“Dissertação apresentada ao Programa de Pós-
graduação em Biotecnologia da Universidade
de Caxias do Sul, visando a obtenção de grau
de Mestre em Biotecnologia”

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 23 DE NOVEMBRO DE 2007.

Orientador: Prof. Dr. Fábio Firmbach Pasqualotto

Comissão Examinadora:

Prof. Dr. **Antônio Marmo Lucon - USP-SP**

Prof. Dr. **José Mauro Madi - UCS-RS**

Prof^ª. Dra. **Eleonora Bedin Pasqualotto - UCS-RS**

*A minha família e meu noivo,
por tudo que representam na minha vida.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, por estar sempre ao meu lado.

Aos meus pais Eraldo e Olga Maria, cujo amor me ensinou a aceitação, a coragem, a dedicação, a persistência e tantas outras coisas que as palavras não conseguem nomear, mas que jamais esquecerei.

Ao meu noivo Claudio a quem procurei nas horas mais difíceis, pelo conforto, compreensão, incentivo e amor. E que ao longo deste tempo sempre soube entender as horas “roubadas”, que o estudo levou.

A minha vó Beatriz pela sua doçura, carinho e inteligência.

Aos meus irmãos Luciana e Júnior, pelos gestos afetuosos de paciência e carinho cujo apoio e amizade me fortaleceram.

A minha afiliada Bibi pela alegria da sua chegada.

Especialmente ao orientador Prof. Dr. Fábio F. Pasqualotto, pelo tempo dedicado e incentivo constante, cuja objetividade e conhecimentos trouxeram contribuição inestimável para o bom andamento e conclusão deste trabalho.

A co-orientadora Prof^a. Dra. Jovana Mandelli pelo apoio, amizade, paciência, idéias e ensinamentos úteis na elaboração desta dissertação.

Ao co-orientador Prof. Dr. Eduardo P. Serafini, por todo auxílio e contribuições importantes para o desenvolvimento deste trabalho.

A Prof^a. Dra. Mirian Salvador, pela orientação no laboratório de estresse oxidativo.

A equipe do ambulatório Central da UCS, chefiada pelo Dr. João Carlos Prativiera, pelo apoio durante a fase de captação dos pacientes.

As Biólogas Edinéia Zimmermann e Kamille P. Losquiavo, que de forma muito competente auxiliaram nas técnicas de biologia molecular.

A acadêmica de medicina Bruna P. Machado, pelo empenho e dedicação, colaborando para o desenvolvimento deste trabalho.

As bolsistas de iniciação científica Karine Giasson e Fernanda Umezu, pela ajuda na realização das técnicas de estresse oxidativo.

A Nilza T.P. Losquiavo, pela sua atenção, boa vontade e competência.

A equipe da *Conception* pela gentileza com que sempre me receberam.

A Farmacêutica Ana Cristina Andrezza, pela sua contribuição fundamental no desenvolvimento da análise estatística.

Aos meus amigos do Centro à Vida: Cristina, Fabiano, Fernando e Ninfa que tornaram a jornada mais amena e que me apoiaram de modo direto ou indireto.

Aos colegas de Pós-graduação, especialmente aqueles que se transformaram em grandes amigos: Tamy, Carla e Crisiane, pelas dicas importantes e bons momentos compartilhados.

Aos professores Maurício M. Silveira e Aldo J.P. Dillon, coordenadores do Programa de Pós-graduação, pela oportunidade de fazer mestrado nesta instituição.

A Capes pelo apoio financeiro.

Aos pacientes voluntários, sem os quais este trabalho não seria possível.

Há muito mais a quem agradecer... A todos aqueles que, embora não nomeados, me brindaram com seus inestimáveis apoios e presenças afetivas, o meu reconhecido e carinhoso muito obrigada!

*“Só existe dois dias no ano que nada pode ser feito.
Um se chama ontem e o outro se chama amanhã, portanto
hoje é o dia certo para amar, acreditar, fazer e
principalmente viver.”*

Dalai Lama

RESUMO

O diagnóstico da infecção pelo papilomavírus humano (HPV) em homens tem ganhado importância já que o mesmo é frequentemente assintomático, o que pode tornar o indivíduo contaminado num reservatório do vírus, com importante papel na transmissão e perpetuação da doença.

Este trabalho teve como objetivo o estudo do HPV no espermatozóide, a fim de avaliar sua influência na qualidade seminal e no estresse oxidativo.

Foram analisados 68 homens, dos quais 30 foram positivos para HPV/DNA e 38 foram negativos. Dos casos positivos, 8/30 apresentaram infecção pelo HPV dos tipos 16 ou 18, os quais são considerados os tipos de alto risco oncogênico com maior prevalência. A infecção e classificação dos tipos virais foram determinadas por nested-PCR, enquanto a atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) foram determinadas por espectrofotometria. Os dados não apresentaram relação significativa entre as variáveis epidemiológicas estudadas e a presença do vírus.

Os parâmetros de concentração e motilidade espermática foram avaliados manualmente, segundo o critério da Organização Mundial da Saúde (OMS) e, a morfologia avaliada, conforme os critérios da OMS e estrito de Tygerberg. Os dados mostram um aumento da incidência de espermatozoides com morfologia alterada nos pacientes com infecção por HPV. Os parâmetros seminais de concentração e motilidade não apresentaram diferenças significativas entre os grupos (com e sem HPV). Nos pacientes portadores do vírus, as medidas de catalase mostraram-se significativamente aumentadas em relação aos pacientes não infectados. O estresse oxidativo pode estar relacionado com a fisiopatologia da infertilidade em pacientes com infecção por HPV no sêmen. Esta infecção sinaliza uma piora na qualidade do sêmen, baseada na alteração da morfologia do espermatozóide.

ABSTRACT

The diagnosis of human papillomavirus infection (HPV) in men has gained importance due to the fact they are frequently asymptomatic, who may be a virus reservoir, with an important role in the transmission and perpetuation of the disease. The goal of this study was to identify the presence of HPV in the semen in order to evaluate its influence in semen quality as well as in seminal oxidative stress.

Sixty-eight men were analyzed, from which 30 were positive for DNA/HPV and 38 negative. Of the positive cases, 8/30 had HPV infection with the subtypes 16 or 18, which are considered with high prevalence for oncogenic risks. The viral infection and the classification of the virus subtypes were determined with the nested-PCR technique, and the enzymatic activities of superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) were determined by spectrophotometry technique. There was no significant correlation among the studied epidemiological variables and the presence of the virus.

The semen parameters sperm concentration and motility were evaluated manually according to the World Health Organization (WHO) criteria and the sperm morphology evaluated according to the WHO and Tygerberg's strict criteria. The results show a higher incidence of sperm with abnormal morphology in patients with HPV infection compared to patients without the infection. Sperm concentration and motility did not show a difference between patients with or without HPV infection. In patients with the HPV, CAT levels were higher than patients without the HPV infection. Seminal oxidative stress may be related to the pathophysiology of infertility in patients with seminal HPV infection. This infection signalize for diminishing semen quality based on the damage of the sperm morphology seen in our study.

LISTA DE QUADROS

Quadro 1- Valores normais para parâmetros de análise seminal	05
Quadro 2- Classificação do HPV	12

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Representação esquemática da estrutura genômica do HPV16.....	11
Figura 2- Verruga genital no pênis de um Afro-americano	14
Figura 3- Fluxograma de classificação das amostras	28
Figura 4- Fluxograma de metodologia	39
Figura 5- Amplificação do gene da β -globina humana e HPV-PCR genérico.....	40
Figura 6- Caracterização da amostra, considerando o tipo viral	41
Figura 7- Amplificação do nested HPV-PCR GP05+/GP06+.....	43
Figura 8- Amplificação do nested HPV 16	44
Figura 9- Amplificação do nested HPV 18	44
Figura 10- Análise morfológica pelo critério estrito de Tygerberg	54
Figura 11- Análise morfológica pelo critério da OMS.....	55
Figura 12- Teste de Endtz em relação ao HPV	59
Figura 13- Atividade da catalase em relação ao HPV	62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Dados epidemiológicos de parceiros sexuais de mulheres portadoras de HPV	47
Tabela 2- Hábitos de parceiros sexuais de mulheres com HPV	48
Tabela 3- Características da vida sexual de parceiros de mulheres com HPV	49
Tabela 4- Avaliação das principais características seminais de cada grupo.....	50
Tabela 5- Avaliação do teste de Endtz e presença de células redondas.	58
Tabela 6- Medida da atividade das enzimas superóxido dismutase e catalase.....	61

LISTA DE ABREVIATURAS

CAT - catalase

DNA - ácido desoxirribonucléico

DST - doença sexualmente transmissível

EO - estresse oxidativo

ERO - espécies reativas de oxigênio

FIV - fertilização *in vitro*

G-6-PDH - glicose-6 fosfato desidrogenase

HPV - papilomavírus humano

LPO - peroxidação lipídica

OMS - organização mundial da saúde

PCR - reação em cadeia da polimerase

PMN - polimorfonucleares

RNA - ácido ribonucléico

SOD - superóxido dismutase

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	01
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	03
2.1. Infertilidade masculina	03
2.2. Morfologia espermática.....	04
2.3. Infecção seminal	07
2.4. Papilomavírus humano	10
2.5. Infecção por papilomavírus humano	13
2.6. Papilomavírus humano em homens.....	15
2.7. Papilomavírus humano e qualidade seminal	18
2.8. Espécies reativas de oxigênio e antioxidantes.....	21
3. OBJETIVOS	26
3.1. Objetivo geral	26
3.2. Objetivos específicos.....	26
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	27
4.1. Coleta do material.....	29
4.2. Métodos	29
4.2.1. Avaliação macroscópica do sêmen.....	29
4.2.2. Avaliação microscópica do sêmen	30
4.2.2.1. Determinação da concentração e motilidade espermática.....	30
4.2.2.2. Determinação da morfologia do espermatozóide	30
4.2.2.3. Avaliação da leucospermia.....	31
4.2.3. Análise da presença do vírus HPV nos espermatozóides	32
4.2.3.1. Extração de DNA	32
4.2.3.2. Amplificação da β -globina e do HPV-PCR genérico.....	32

4.2.3.3. Separação e análise dos segmentos amplificados.....	33
4.2.3.4. Amplificação do HPV por nested - PCR.....	33
4.2.3.5. Detecção do HPV 16 e HPV 18.....	34
4.2.3.6. Amplificação do HPV 16 por nested - PCR.....	35
4.2.3.7. Amplificação do HPV 18 por nested - PCR.....	36
4.2.4. Mensuração dos níveis de superóxido dismutase e catalase	36
4.2.4.1. Determinação da atividade da enzima superóxido dismutase	36
4.2.4.2. Determinação da atividade da enzima catalase	37
4.2.4.3. Determinação das proteínas totais	37
4.3. Análise estatística	38
4.4. Fluxograma de metodologia	39
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
6. CONCLUSÕES.....	65
7. PERSPECTIVAS.....	66
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67
ANEXO A: Descrição dos oligonucleotídeos	79
ANEXO B: Termo de consentimento livre e esclarecido	80
ANEXO C: Ficha de avaliação.....	83
ANEXO D: Artigo publicado na revista Reprodução e Climatério.....	85

1. INTRODUÇÃO

Infertilidade acomete 10 a 15% da população sexualmente ativa, independente de fatores sociais, econômicos ou culturais. Tradicionalmente, o diagnóstico de infertilidade masculina depende de uma avaliação descritiva dos parâmetros do ejaculado, com ênfase na concentração, motilidade e morfologia dos espermatozoides. Comprova-se a importância da morfologia quando se avalia estudo recente, o qual demonstrou que, dentre as três características seminais mais importantes do sêmen (concentração, motilidade e morfologia), a morfologia de Tygerberg é a mais importante para prever fertilidade. Entretanto, é necessário enfatizar que a análise da qualidade seminal não é um teste de fertilidade.

A infertilidade masculina pode ser causada por vários fatores, sendo que, em até 30 a 40% dos casos, não se descobre o fator etiológico pelo qual a infertilidade se manifesta. A infertilidade idiopática é uma situação séria, visto que acomete uma elevada porcentagem de homens inférteis que não podem ser tratados com as modalidades terapêuticas empíricas aplicadas atualmente.

Uma das causas de infertilidade são as doenças sexualmente transmissíveis (DSTs); dentre essas, a infecção pelo papilomavírus humano (HPV) é considerada uma das mais comuns no mundo. Este vírus tem sido associado à infertilidade de casais nos quais o homem possui infecção por HPV, podendo estar associado à diminuição da motilidade do espermatozóide e ao aborto. A infecção persistente pelo HPV foi detectada no trato genital feminino, no material de aborto e foi demonstrada a presença do HPV no sêmen humano.

Estudos sugerem que o HPV pode infectar não apenas células espermáticas humanas, mas também que certos genes importantes para o HPV são expressos ativamente

nos espermatozoides. Desta forma, provavelmente, os espermatozoides infectados pelo vírus do HPV possam se comportar como vetores ou carreadores para a transmissão do HPV para a parceira durante relação sexual, os fetos por meio de oócitos fertilizados, ou ambos.

Outra causa de infertilidade, hoje é atribuída ao estresse oxidativo (EO). O espermatozoide humano representa apenas uma de uma extensa lista de células que possuem a capacidade de gerar espécies reativas de oxigênio (ERO) quando incubados em ambiente aeróbio. Portanto, o oxigênio representa um grande paradoxo: enquanto são requeridos para fisiologia celular, seus metabólitos podem ser potencialmente tóxicos, sendo que, alguns destes metabólitos, podem ser produzidos pelos próprios espermatozoides e podem gerar efeitos tóxicos na função espermática. Recentemente, pesquisadores demonstraram a grande produção de ERO em pacientes com infecção seminal.

O presente trabalho visa relacionar a presença do HPV com as principais características seminais (concentração, motilidade e morfologia), bem como avaliar os marcadores de estresse oxidativo e comparar pacientes que apresentem positividade para o HPV com pacientes negativos para esta infecção viral.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Infertilidade masculina

Infertilidade é definida como a incapacidade de um casal sexualmente ativo, sem a utilização de métodos contraceptivos, de estabelecer gravidez no período de um (World Health Organization, 1999) a dois anos (Eshre, 1996), baseando-se no fato de que, aproximadamente 90% dos casais, atingem gravidez no primeiro ano e 95%, o faz em dois anos. É um fenômeno universal que acomete de 10% a 15% dos casais, independente dos fatores sociais, econômicos ou culturais (Galarneau & Nagler, 1999), sendo que o fator masculino na infertilidade é responsável por 25% a 30% dos casais (Jones & Toner., 1993).

A infertilidade masculina pode resultar de uma série de alterações adquiridas ou congênitas, relacionadas à genitália masculina. A maioria dos homens inférteis apresenta oligozoospermia (número de espermatozóides inferior a 20×10^6 espermatozóides/mL), astenozoospermia (motilidade inadequada - motilidade A e B inferior a 50%) ou teratozoospermia (espermatozóides com morfologia normal inferior a 30% segundo critério da Organização Mundial da Saúde ou 14% segundo critério estrito de Tygerberg), que indicam alterações quantitativas e qualitativas na espermatogênese (Seibel, 1996); porém estes indivíduos são saudáveis e assintomáticos. É necessário enfatizar que a análise seminal (motilidade, morfologia e concentração) não é um teste de fertilidade.

Atualmente, o número absoluto de espermatozóides não prediz o prognóstico de fertilidade, por isso, testes *in vitro* foram desenvolvidos para monitorar a capacidade funcional dessas células (Sharma & Agarwal, 1996; Ombelet *et al.*, 1997).

Nos últimos 10 anos, houve um grande progresso no entendimento a respeito do processo reprodutivo masculino em níveis biológicos, moleculares e genéticos. Pesquisas na área da fisiologia espermática retificaram idéias anteriormente difundidas e consideradas verdades absolutas, como, por exemplo, a idéia que se tinha que a análise seminal convencional fosse um critério para diagnosticar a fertilidade masculina (Aitken *et al.*, 1982). O diagnóstico mais preciso do local ou função anormal tem motivado pesquisadores a desenvolver novos testes bioquímicos para avaliar a função espermática, os quais são igualmente importantes para predizer o sucesso da Fertilização *in Vitro* (FIV) e decidir sobre a técnica de reprodução assistida mais indicada (Sharma *et al.*, 1999b; Hallak *et al.*, 2001).

Desta forma, apenas as provas de função espermática, como, por exemplo, testes para avaliar a reação acrossômica, movimento de hiperativação, níveis de creatina kinase e estresse oxidativo, podem dar informações referentes à probabilidade de um homem vir a engravidar a sua parceira (Sharma *et al.*, 2000).

2.2 Morfologia espermática

A fertilidade é um fenômeno complexo e multifatorial que envolve a avaliação do casal. Tradicionalmente, o diagnóstico de infertilidade masculina depende de uma avaliação descritiva das características do ejaculado, com ênfase nos parâmetros de concentração, motilidade e morfologia dos espermatozoides (OMS, 1999), valores normais demonstrados no quadro 1.

QUADRO 1: Valores normais para parâmetros de análise seminal

PARÂMETRO SEMINAL	VALORES NORMAIS
Volume	≥ 2,0 mL
pH	7,2-8,0
Cor	branco opaco
Liquefação	≤ 30 minutos, completa
Viscosidade	normal
Concentração espermática	≥ 20x10 ⁶ espermatozóides por mL de sêmen
Número total de espermatozóides	≥ 40x10 ⁶ espermatozóides por ejaculado
Motilidade	≥ 50% com progressão linear A+B *
Morfologia	≥ 30% com formas normais
Vitalidade	≥ 75% de formas vivas

Os valores foram estipulados conforme estabelecido pela Organização Mundial da Saúde (OMS, 1999).

* A: rápida progressiva; B: lenta progressiva; C: motilidade não-progressiva; D: imóvel.

A pobre qualidade seminal do ejaculado humano nos separa de muitos dos outros mamíferos (Birkhead, 1999). Mesmo em uma população de homens férteis, até 50% dos espermatozóides do ejaculado podem apresentar alterações na motilidade ou morfologia (OMS, 1999). Acredita-se que, para acontecer a fertilização do gameta feminino pelo masculino, é necessário apenas um número mínimo de espermatozóides com movimentos progressivos e morfologicamente normais (Aitken, 2006). De acordo com várias pesquisas, acredita-se estar ocorrendo um fenômeno de diminuição da qualidade seminal em todo o mundo, portanto, as características seminais têm variado conforme as diversas edições publicadas pela Organização Mundial da Saúde (OMS) (Auger *et al.*, 1995; Pasqualotto *et al.*, 2000a; Andersen *et al.*, 2000).

Além disso, o critério de normalidade na morfologia espermática, estabelecida pela OMS, não se relaciona com os resultados de fertilização advinda de técnicas de reprodução assistida comparado aos padrões de morfologia estrita de Tygerberg (Kruger *et al.*, 1988). No entanto, a fim de padronizar os resultados obtidos em locais diferentes, os testes que envolvem sêmen são realizados consoante com determinadas normas, tais como aquelas estabelecidas pela OMS (OMS, 1999).

Para avaliar morfologia, os melhores laboratórios de reprodução humana têm utilizado muito o critério estrito de Tygerberg, segundo o qual o resultado superior a 14% é considerado normal, enquanto que valores inferiores a 4% são referidos como patológicos (Kruger *et al.*, 1988). Resultados de formas normais entre 4% e 14% são considerados como limites inferiores da normalidade. Estes números foram baseados na morfologia dos espermatozóides que migraram pela cérvix uterina. Desde então, um resultado de morfologia pelo critério estrito de Tygerberg normal é considerado um excelente fator preditivo de sucesso nos procedimentos de reprodução assistida de alta complexidade (FIV). Oehninger *et al.* (1988) observaram que as taxas de fertilização foram, aproximadamente, de 94% após a realização de técnicas de reprodução assistidas com formas consideradas normais de espermatozóides, conforme o critério estrito de Tygerberg (morfologia superior a 14%). Além disso, esses pesquisadores mostraram que pacientes que apresentavam padrão considerado limítrofe ou bom de morfologia espermática (morfologia variando de 4% até 14%), apresentaram taxas de fertilização de, aproximadamente, 88%, enquanto que, em pacientes com espermatozóides tidos como anormais (morfologia inferior a 4%), apenas 14,5% fertilizaram suas parceiras (Oehninger *et al.*, 1988). Apesar de este teste ser muito atraente, quando considerados os resultados de fertilização, a avaliação da

morfologia requer mais habilidade e treinamento quando comparados à avaliação da concentração e motilidade dos espermatozóides.

Espermatozóides com morfologia alterada, principalmente aqueles com gota citoplasmática, produzem elevadas concentrações de ERO (Gomez *et al.*, 1996; Zini *et al.*, 1999). Estes, quando produzidos em excesso, promovem fenômenos de disfunção espermática. É de extrema importância avaliarmos o real benefício de substâncias neutralizadoras das ERO (antioxidantes) em amostras seminais de pacientes com espermatozóides imaturos. Dentre as patologias mais relacionadas com alterações na qualidade seminal, encontra-se a infecção seminal.

2.3 Infecção seminal

A incidência de leucospermia varia de 9% a 23% da população subfértil, representando uma área importante de estudo. Mas a relação entre leucospermia e infecção permanece pouco entendida. A maioria dos homens com leucospermia possui culturas seminais que falham em mostrar uma infecção ativa do trato genital. Estudos que documentam associação entre patógeno específico no sêmen e leucospermia, apresentando resultados conflitantes, visto que em alguns casos foi demonstrada a presença de leucospermia e em outros não quando da presença de infecção seminal. Conseqüentemente, alguns pesquisadores recomendam incluir a determinação de marcadores ativos, os quais são produzidos pelos leucócitos ativados no diagnóstico de inflamação e/ou infecção das glândulas acessórias (Pasqualotto *et al.*, 1999). Isso parece ter um propósito racional devido ao fato de que a simples contagem de leucócitos ficarem então amparada por um parâmetro de atividade funcional.

Uma análise sistemática da relação entre os níveis de marcadores de ativação leucocitária (citoquinas, elastase, ERO) pode ser útil como marcador de infecção do trato genital e/ou urinário. Os níveis dos marcadores de ativação leucocitária e os parâmetros de fertilidade são importantes para o diagnóstico de infecção subclínica e infertilidade. Mais de um milhão de leucócitos por mililitro (mL) de sêmen é considerado anormal. Porém, uma leucospermia superior a dois milhões de leucócitos por mililitro de sêmen parece estar mais correlacionado com anormalidades seminais significativas.

Existem muitas evidências de que os leucócitos (principalmente os Granulócitos Polimorfonucleares - PMN) são considerados a principal fonte de produção de ERO no plasma seminal (Potts *et al.*, 2001; Oschendorf , 1999; Lemkecher *et al.*, 2005). De fato, apenas um PMN é capaz de produzir 1000 a 10000 vezes mais ERO comparado à produção de ERO por qualquer tipo de espermatozóide (Pasqualotto *et al.*, 2000b; Sharma *et al.*, 2001).

A geração de elevados níveis de ERO pelos leucócitos pode exercer um efeito deletério importante na função dos espermatozoides como indicado por uma redução importante na motilidade espermática e capacidade de penetração oocitária (Aitken *et al.*, 1991; Sharma *et al.*, 1999a; Baker& Aitken, 2005). Pacientes com leucospermia geralmente apresentam elevadas quantidades de espermatozoides imaturos com alteração na morfologia, especialmente presença de espermatozoides com grande quantidade de citoplasma residual (Gil-Guzman *et al.*, 2001). Acredita-se que, devido à grande produção de leucócitos, homens fumantes apresentam elevadas concentrações de ERO, alteração na morfologia espermática e, muitas vezes, infertilidade (Pasqualotto *et al.*, 2008). Tortolero *et al.* (2004) reportaram a associação da leucospermia com redução do número e da motilidade dos espermatozoides.

Recentes publicações têm sugerido que as citocinas e as ERO talvez interajam na mediação dos efeitos tóxicos da inflamação. As ERO são geradas, ao menos parcialmente, pelos leucócitos seminiais em resposta aos vários fatores infecciosos e estimulantes das citocinas. Essa relação sugere que, em casos de infecção das glândulas acessórias masculinas, a pobre qualidade espermática talvez decorra do excesso de produção de ERO e/ou uma citocina em particular produzida no local ou pelos leucócitos.

As conseqüências advindas da leucospermia dependem:

- da composição celular da população de leucócitos;
- da natureza do estímulo patogênico que induz à infiltração leucocitária;
- do estado de ativação da população leucocitária;
- da habilidade das secreções das glândulas acessórias em proteger os

espermatozóides das citocinas tóxicas e ERO geradas pelos leucócitos.

O dano causado aos espermatozóides pode ser moderado, se a infiltração leucocitária ficar confinada à próstata ou às vesículas seminiais. Nestas circunstâncias, o espermatozóide apenas entra em contato com as ERO geradas pelos leucócitos no momento da ejaculação. Entretanto, se os leucócitos foram originados no epidídimo ou testículo, as ERO poderão interagir com a membrana espermática por um longo período, aumentando as possibilidades de danificar os espermatozóides (Oschendorf, 1999; Vicari, 1999).

O Estresse Oxidativo é altamente variável devido aos níveis de antioxidantes. Homens com altos níveis de antioxidantes talvez tolerem uma produção superior de ERO pelos leucócitos, enquanto que os espermatozóides de homens desprovidos da proteção realizada pelo plasma seminal podem sofrer danos causados por

uma concentração de leucócitos tão baixa quanto 600 mil leucócitos por mililitro. Talvez esse fato explique porque muitos homens não apresentam prejuízos na qualidade seminal a despeito de altos níveis de leucócitos presentes no sêmen. É prudente considerar a população leucocitária como potencialmente prejudicial e continuar a monitorar pacientes para leucospermia, usando novos testes bioquímicos, como: ERO ou concentração de citocinas - chave (Sharma *et al.*, 2001).

Bezold *et al.* (2007), estudando pacientes de uma clínica de infertilidade, relataram associação entre leucospermia e parâmetros seminais pobres (diminuição da concentração espermática e da porcentagem de formas normais), assim como DST/DNA foi associado com diminuição significativa na concentração, motilidade e concentração total de espermatozóides, confirmando estudos anteriores que DSTs e leucospermia estão associadas com a pobre qualidade seminal (Kapranos *et al.*, 2003; Wolff *et al.* 1990; Kotronias & Kapranos, 1998; Lai *et al.* 1997).

2.4 Papilomavírus humano

O papilomavírus humano (HPV), um microorganismo da família *Papillomaviridae* (Howley & Lowy, 2001), é o agente causador de vários processos proliferativos em epitélios, entre os quais lesões benignas como os papilomas e lesões malignas como o câncer de colo do útero, pênis e outros. A infecção pelo HPV é uma das DSTs mais comuns e em constante ascensão.

São partículas de DNA viral, não envelopado, não cultivável, contendo uma dupla fita de DNA, circular, constituído por 6800 a 8400 pares de bases, com diâmetro de

52-55 nm, coberto por um capsídeo (formado por 72 capsômeros), com forma icosaédrica, o que lhes confere aparência esférica à microscopia eletrônica.

Seu genoma está formado por 10 regiões codificadoras ou de transcrição (ORF), que são denominadas precoces e tardias, e uma não codificadora (LCR) (Margall, 2006), sendo elas (figura 1):

- Segmento E (“*early*”, expressão precoce), representa 45% do genoma viral, com os genes E1 a E7 que codificam as proteínas implicadas nos processos de replicação, transcrição e transformação do DNA celular;

- Segmento L (“*late*”, expressão tardia), representa 40% do genoma, com os genes L1 e L2 implicados na formação do capsídeo viral;

- Segmento LCR (*long control region*), representa 15% do genoma, contém os genes implicados na regulação da transcrição e replicação.

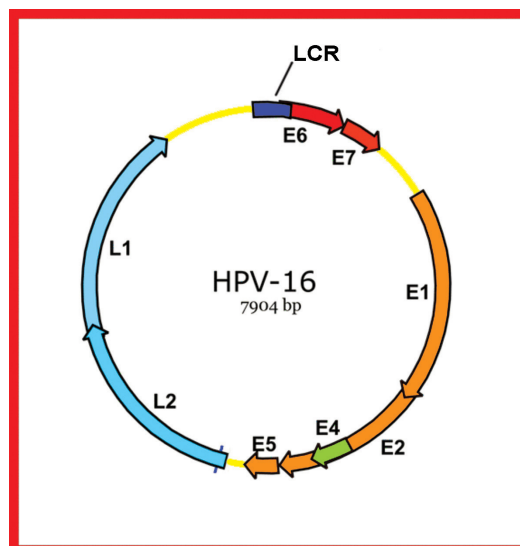


FIGURA 1: Representação esquemática da estrutura genômica do HPV 16

A classificação dos diferentes genótipos de HPV se faz mediante a homologia de seqüências, principalmente as correspondentes a E6, E7 e L1 (Garcia *et al.*, 2005), a qual deve ser pelo menos 10% diferente de qualquer outro tipo de HPV (Villiers *et al.*, 2004).

Atualmente, já foram identificados mais de 100 tipos de HPV, segundo suas diferenças na seqüência de DNA, dos quais, aproximadamente 40, podem infectar a região anogenital (Molijn *et al.* 2005). De acordo com seu potencial oncogênico, os diferentes tipos de HPV podem ser agrupados em duas categorias: baixo risco, tipos isolados de lesões benignas, ou infecções subclínicas que podem ser transitórias, representadas principalmente pelos HPVs 6 e 11; e alto risco, associados a diferentes graus de lesões escamosas intraepiteliais do colo de útero, vagina, pênis e carcinomas cervicais, representadas pelos HPVs 16 e 18. Munõz *et al.* (2003) sugeriram uma terceira categoria, compreendendo os tipos considerados de provável risco oncogênico, conforme mostra o quadro 2.

QUADRO 2: Classificação do HPV

CLASSIFICAÇÃO DO RISCO	TIPOS DE HPV
Alto risco	16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 68, 73,82
Provável alto risco	26, 53,66
Baixo risco	6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72,81
Risco indeterminado	34, 57,83

Classificação dos HPVs de acordo com o potencial oncogênico, segundo Munõz *et al.*, 2003

2.5 Infecção por papilomavírus humano

A infecção pelo HPV ganhou importância pela sua grande incidência, elevada prevalência, alta infectividade, facilidade de contágio e estreita relação com câncer de colo de útero e de pênis. Em 99,7% dos cânceres de colo uterino existe HPV/DNA, sendo o tipo 16 a causa de 57,6% e, se considerarmos também o tipo 18, esta relação passa para 71,7% (Munõz, 2000).

No mundo inteiro, a infecção por HPV vem alcançando proporções epidêmicas, tornando-se a DST mais freqüente na população sexualmente ativa. Estima-se que a prevalência em mulheres varie entre 2% a 44% (Bosch & Sanjose, 2003) e, entre os homens, varie de 3,5% a 45% (Partridge & Koutsky, 2006), chegando a atingir, nos Estados Unidos, de 5% a 20% da população na faixa etária de 15 a 49 anos – cerca de oito vezes mais freqüente que há 20 anos.

Projetando para o Brasil, estima-se a existência de 6 a 12 milhões de homens infectados pelo HPV. Apesar da grande prevalência da infecção, somente 1% dos infectados apresentam o condiloma clássico (Gilbert, 2003), a manifestação clínica mais comumente conhecida da infecção genital pelo HPV (figura 2), onde apenas 2% podem ser visíveis com o ácido acético. A maioria das infecções são assintomáticas ou subclínicas e tornam-se indetectáveis com o passar do tempo (Dunne *et al.*, 2006), sendo uma doença particularmente difícil de manipular e controlar.



FIGURA 2: Verruga genital no pênis de um Afro-americano
Adaptado de: Partridge & Koutsky, 2006.

A atividade sexual, o número de parceiros, o tabagismo, a higiene genital deficiente, o uso de contraceptivos orais, outras doenças sexualmente transmissíveis e a imunidade celular do indivíduo são fatores de risco importantes para infecção por HPV, bem como para o desenvolvimento de neoplasias associadas ao HPV (Gross & Barrasso, 1999).

O HPV é principalmente transmitido pelo contato sexual (Rotola *et al.*, 1994) e a taxa de transmissão esperada, entre parceiros, é de aproximadamente 60% (Brown *et al.*, 1999), mas modos não sexuais de transmissão do vírus também devem ser considerados. Estes incluem transmissão vertical dos pais para os filhos, transmissão horizontal a partir de outros membros da família e aqueles em contato próximo, auto-inoculação de um local para outro e, possivelmente, transmissão indireta via fomites (Syrjänen & Puranen, 2000). O HPV, fora do organismo, tem pouca resistência e, por este motivo, a transmissão por

fomites é viável por um curto período de tempo. O papilomavírus humano tem sido detectado em fluido amniótico (Xu *et al.*, 1998), membranas fetais (Wang *et al.*, 1998), célula trofoblástica da placenta (Favre *et al.*, 1998), sêmen (Giovannelli *et al.*, 2007; Bezold *et al.*, 2007; Rintala *et al.*, 2005; Rintala *et al.*, 2004), plasma seminal e espermatozóides (Lai *et al.*, 1996), epidídimo e ducto deferente (Svec *et al.*, 2003), vaso deferente (Rintala *et al.*, 2002) assim como em material de aborto espontâneo (Hermonat *et al.*, 1997). No entanto, pode-se adquiri-lo com poucos ou somente após muitos contatos com o vírus e/ou mesmo não adquiri-lo. Além da carga viral, o tipo de vírus e as condições imunológicas do hospedeiro, duração e frequência da exposição interferirão no contágio (Patridge & Koutsky, 2006).

O DNA do vírus atinge o núcleo da célula onde permanece por algum tempo na forma episomal (circular sem se integrar ao genoma). Em algum momento, ocorre a integração com o genoma do hospedeiro, a tradução, a transcrição do ácido desoxirribonucléico (DNA) em ácido ribonucléico (RNA) e modificações fenotípicas características do HPV na célula hospedeira.

Pouco se conhece da infecção no homem, entretanto se extrapolarmos os dados de infecção na mulher para estes, 65% das infecções regredem espontaneamente, 14% possuem um alto índice de recorrência e 45% dos pacientes tratados podem manter o vírus latente, ou seja, serem portadores.

2.6 Papilomavírus humano em homens

Embora não tenha sido tão extensamente estudada como a infecção em mulheres, a infecção por HPV em homens parece ser bem comum, sendo frequentemente

subclínica, o que permite ao vírus se difundir silenciosamente. Ainda não se conhece alguns aspectos das características da infecção masculina, como tempo de latência e de manifestação da enfermidade (Garcia *et al.*, 2005), apesar de o homem possuir importante função na disseminação do HPV e muito ser discutido sobre a importância do seu tratamento para a redução das taxas de lesões precursoras do câncer de colo uterino e peniano. O câncer peniano é uma neoplasia rara em nações desenvolvidas, representando 0,4% dos tumores no homem. Porém, países em desenvolvimento como o Brasil, as incidências variam de 1% a 4% nas regiões sul e sudeste e de 5% a 16%, no norte e nordeste.

Em estudos nos quais múltiplos locais anatômicos ou amostras foram analisadas, a prevalência de HPV em homens foi de 1,3 % a 72,9% , sendo que a grande variação foi devido à diversidade de materiais clínicos analisados (pela falta de concordância do local anatômico que deveria ser coletado), aos diferentes testes aplicados, bem como a variação dentro da população e entre populações (Dunne *et al.*, 2006). Com relação ao HPV 16, foi detectada soropositividade de 7,9%, na população masculina dos Estados Unidos da América (Stone *et al.*, 2002). Estudos avaliando o HPV seminal demonstraram prevalência de 2,2% a 82,9%, independente de o estudo comparar múltiplos locais anatômicos e amostras (Rintala *et al.*, 2002; Astori *et al.*, 1995), ou analisar o sêmen como uma amostra única (Kyo *et al.*, 1994; Lai *et al.*, 1997; Tanaka *et al.*, 2000; Olatunbosun *et al.*, 2001; Aynaud *et al.*, 2002). Nestes mesmos estudos, o HPV tipo 16 foi apresentado entre os mais comuns, apesar de outros tipos também terem sido relatados (tipos 6, 11, 18, 31, 33, 42, 52, 53, 54, 59 e 84).

Alguns trabalhos demonstraram a existência de genótipos de baixo e alto risco de HPV no sêmen, confirmando a probabilidade de que o sêmen possa ser

contaminado por HPV que está localizado na uretra, no momento da ejaculação (igualmente como ocorre com herpes vírus e citomegalovirus) (Kyo *et al.*, 1994; Aynaud *et al.* 2002). Porém, também é certo que sua existência foi detectada em 18,5% de amostras obtidas cirurgicamente durante vasectomia (Rintala *et al.* 2002). As conseqüências deste achados são muitas, podendo estar implicado na prostatite inespecífica ou produzir, de forma iatrogênica, uma DST na mulher receptora a partir de amostras de sêmen obtidas de homens sem aparente HPV para serem utilizadas na FIV. Neste caso, o sêmen processado não assegura a eliminação das partículas virais veiculadas pelo espermatozóide (Olatunbosun *et al.*, 2001) e estes podem transportar DNA viral para dentro dos óvulos a serem fertilizados (Chan *et al.*, 1996), podendo afetar sua implantação no útero, assim como o desenvolvimento posterior do embrião. Isto então justificaria a necessidade de testes para a detecção de HPV nos doadores de sêmen, a fim de evitar as conseqüências médico legais que podem derivar de sua realização (Garcia *et al.*, 2005).

Aynaud *et al.* (2002) sugerem que a contaminação do sêmen pelo HPV ocorre pela esfoliação de células infetadas das lesões uretrais, durante a ejaculação, ou por abrasão da lesão peniana durante a coleta, o que pode culminar com a contaminação do sêmen. Provavelmente, os espermatozoides infectados pelo vírus do HPV possam se comportar como vetores ou carreadores para a transmissão do HPV para a parceira durante relação sexual, aos fetos por meio de oócitos fertilizados, ou ambos (Lai *et al.*, 1996). Bosch *et al.* (1996) sugerem que a condição de homem como portador deve ter uma duração relativamente curta, próxima à exposição.

Então o diagnóstico da infecção pelo HPV no homem ganha importância, já que, freqüentemente, é assintomático, o que torna o individuo contaminado um reservatório de vírus, com um papel determinante na transmissão e perpetuação dessa doença, mas

poucos estudos têm focado os fatores de risco para HPV, os quais têm mostrado associação a variáveis relacionadas com o comportamento sexual, assim como múltiplos parceiros sexuais, DST anterior, idade e não uso de preservativo (Castellsague *et al.*, 1997).

2.7 Papilomavírus humano e qualidade seminal

Apesar de alguns estudos relatarem a presença de HPV nas células espermáticas humanas, o papel da infecção viral na qualidade seminal permanece por ser completamente elucidada.

Alguns tipos de infecção viral têm sido citados como causadores de aborto ou anomalias fetais e, infecção por HPV no trato genital, pode ter o potencial de afetar o desenvolvimento embrionário e o resultado reprodutivo. O HPV foi detectado em células espermáticas infectadas, onde genes HPV-específicos estão sendo ativamente expressados, sugerindo que parâmetros, como motilidade, podem ser afetados pela presença de HPV e que também a astenozoospermia pode estar associada com a infecção pelo HPV (Lai *et al.*, 1996; Lai *et al.*, 1997; Brossfield *et al.*, 1999).

Estudos demonstram, por técnicas de FIV, que oócitos e embriões podem facilmente receber HPV/DNA exógeno (Chan *et al.*, 1995), indicando que a infecção por HPV pode ocorrer ainda nos primeiros estágios de desenvolvimento. Experimentos *in vitro* usaram espermatozóides como vetor para introduzir DNA exógeno dentro de oócitos e embriões (Lavitrano *et al.*, 1989), sugerindo a possibilidade de transmissão do HPV para os oócitos fertilizados através do espermatozóide infectado (Lai *et al.*, 1996). Contudo, a influência da infecção por HPV, nos primeiros estágios de desenvolvimento embrionários e na reprodução, ainda é pouco conhecida.

Lai *et al.* (1997) estudaram sêmen de 24 homens atendidos em um centro de fertilidade, relatando que a incidência de astenozoospermia nos pacientes, infectados com HPV tipo 16 ou 18, foi significativamente alta quando comparada aos pacientes sem infecção por HPV (75% vs 8%), e que alguns parâmetros, como motilidade, foram significativamente afetados pela presença do vírus no espermatozóide.

Kadze *et al.* (2002), estudando sêmen de doadores, sugeriram que a transferência de HPV/DNA exógeno tipo 16, a partir de espermatozóides, pode ocorrer em 52-68% das células cumulus, determinando o papel do espermatozóide como vetor na transmissão do HPV, que pode conduzir à falhas precoces de implantação, corroborando os achados de que o espermatozóide possui a capacidade de transferir HPV/DNA tipo 16 e 18 para células que cobrem a cavidade uterina (Chan *et al.*, 1996).

Outros estudos verificaram a infecção por HPV 16 e/ou 18 em células espermáticas (Pao *et al.*, 1996; Chan *et al.*, 1994), correlacionando estes dois tipos de HPV com infertilidade masculina. Particularmente, o HPV 16 tem sido implicado como a causa de alguns abortos espontâneos (Hermonat *et al.*, 1997).

Olatunbosun *et al.* (2001) analisaram amostras seminais de 85 voluntários, em estudo longitudinal, para determinar a presença de HPV/DNA no espermatozóide e identificar se o processamento seminal remove o vírus. Das amostras estudadas, 23% (27/85) apresentaram HPV no sêmen. Após o processamento seminal, 25/27 permaneceram positivas para HPV; portanto, o procedimento de processamento seminal reduziu o HPV a níveis indetectáveis por PCR em apenas 2 casos. Este achado demonstra que as técnicas usadas para tratamento das amostras de doadores de sêmen, não são suficientemente seguras para garantir a exclusão do risco de transmissão do HPV para o receptor. Portanto,

os autores sugerem a identificação de HPV no sêmen de possíveis doadores e a exclusão do material doado nos casos positivos.

Bezold *et al.* (2007), em estudo realizado no *Brigham and Women's Hospital* em *Massachusetts*, analisaram amostras seminais de 241 pacientes com infertilidade idiopática, dos quais 132 apresentaram leucospermia e 109 não; a idade variou de 22-55 anos. Usando técnicas de biologia molecular, HPV/DNA foi detectado em 4,5% das amostras, sendo verificada, neste estudo, associação entre presença de HPV e uma diminuição significativa na contagem total de espermatozóides, além da tendência, estatisticamente não significativa, de baixa motilidade espermática, porém não verificaram associação entre presença de HPV/DNA e leucospermia. Dos oito (8) casos HPV/DNA positivos, três (3) foram tipados como HPV-16, enquanto os outros cinco (5) foram indeterminados.

Por outro lado, outros estudos demonstraram não existir significante correlação entre infecção por HPV no espermatozóide e qualidade do sêmen (Rohde *et al.*, 1999; Tanaka *et al.* 2000; Erles *et al.*, 2001).

Rintala *et al.* (2004) realizaram um estudo na Finlândia, usando amostras seminais de 65 futuros pais (20-43 anos). A análise seminal foi baseada nos parâmetros da OMS (volume, concentração, motilidade e pH) e a detecção do vírus foi por nested PCR (MY09/MY11 e GP05+/GP06+). Dez, de sessenta e cinco casos (15,4%), foram positivos para HPV de alto risco no espermatozóide, porém o estudo demonstra que a presença de HPV no espermatozóide não afeta significativamente a medida dos parâmetros seminais, apesar da tendência em direção à danificação da maioria das características físicas, volume, motilidade e viabilidade na amostras HPV positivas, quando comparadas com sêmen HPV

negativo. Assim sendo, os resultados deste estudo não sugerem associação entre HPV seminal e oligozoospermia ou astenozoospermia.

O estudo demonstrou que o pH do sêmen foi mais baixo nas amostras positivas para HPV, do que nas negativas. Entretanto, sabe-se que infecções genitais assintomáticas crônicas estão associadas com baixa fertilidade por meio ERO e causam alteração no pH seminal por alterações prostáticas ou das vesículas seminais, dependendo do local onde as mesmas estão sendo produzidas (Rintala *et al.*, 2004).

2.8 Espécies reativas de oxigênio e antioxidantes

Um dos parâmetros bioquímicos, que tem sido muito estudado nos últimos anos, são as ERO. Este é um termo coletivo, freqüentemente usado para incluir, não apenas radicais livres de oxigênio, mas também alguns não-radicaís derivados do O₂ capazes de gerar radicais livres. São exemplo de ERO o ânion superóxido (O₂⁻), radical hidroxila (OH[·]) e o peróxido de hidrogênio (H₂O₂). Radical livre pode ser definido como estruturas altamente reativas, instáveis e que possuam um ou mais elétrons não-pareados na sua camada de valência (Halliwell & Gutteridge, 2000), ou seja, ocupando um orbital atômico ou molecular sozinho, gravitando em sentido oposto aos outros elétrons. A toxicidade ao oxigênio é um fenômeno inerente a todas as espécies que necessitam de ambiente aeróbio para a sua sobrevivência. Apesar da geração controlada de ERO possuir efeitos fisiológicos (segundo mensageiros) em diferentes tipos celulares, o excesso de ERO pode gerar estresse oxidativo (EO), o qual está associado ao envelhecimento, diabetes, infarto do miocárdio, catarata, artrite reumatóide, infecções em geral e câncer, entre outras (Koh *et al.*, 1997; Rodhen *et al.*, 2001).

Portanto, EO, é definido como uma situação de desequilíbrio entre a produção de ERO e sua neutralização pelos antioxidantes (Sikka, 1996; Pasqualotto *et al.*, 2001a; Pasqualotto *et al.*, 2001b; Saleh *et al.*, 2002; Agarwal & Prabakaran, 2005). As ERO podem alterar o RNA e DNA, causar o fenômeno da Peroxidação Lipídica (LPO), afetando primariamente a estrutura e a função da membrana celular e, conseqüentemente, causar alterações importantes nas proteínas (Twig, *et al.*, 1998; Zalata *et al.*, 1998; Storey *et al.*, 1998), sendo o espermatozóide humano altamente susceptível ao estresse oxidativo.

As membranas celulares estão sujeitas ao ataque das ERO por possuírem grande conteúdo de ácidos graxos poliinsaturados nos fosfolipídios, os quais são particularmente sensíveis a reações oxidativas (Storey *et al.*, 1998). Com a LPO, existe uma perda na fluidez da membrana espermática, prejudicando o bom funcionamento de espermatozóide e a sua fusão com o oócito (Aitken *et al.*, 1991; Agarwal & Prabakaran, 2005; Aitken&Baker, 2006). Além disso, a LPO prejudica a troca iônica realizada pela membrana do espermatozóide, danificando a motilidade espermática normal (Kobayashi *et al.*, 1991; Agarwal & Ferreira, 2004; Dokmeci, 2005).

Quando a espermatogênese se apresenta prejudicada, os mecanismos de extrusão citoplasmática apresentam-se defeituosos e o espermatozóide liberado pelo epitélio germinativo possui uma grande quantidade de citoplasma residual (Zini *et al.*, 1999; Gil-Guzman *et al.*, 2001). Acredita-se que a retenção de citoplasma residual pelo espermatozóide humano, esteja correlacionada positivamente com a geração de ERO por meio de mecanismos mediados pela enzima citosólica Glicose-6-Fosfato Desidrogenase (G-6-PDH) (Sharma & Agarwal, 1996).

Muito embora na infertilidade masculina as ERO sejam conhecidas principalmente por seus efeitos deletérios na função espermática, existem evidências

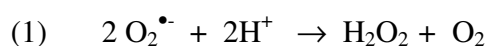
suficientes para apoiar a hipótese de que, em baixas e controladas concentrações, as espécies reativas participam nos mecanismos de sinalização da transdução (Sikka, 1996). As ERO facilitam a reação acrossômica por meio de um efeito estimulatório na fosfolipase A₂ presente no espermatozóide humano (Riley & Berhrman, 1991). Além disso, as ERO auxiliam na ativação da fosforilação da tirosina, desempenhando papel importante na mediação da ligação do espermatozóide ao oócito (Sharma & Agarwal, 1996), demonstrando a importância do equilíbrio adequado entre antioxidantes e baixos níveis de ERO que são necessários para função espermática normal (Zini et al, 2000).

Estudos mostraram que níveis aumentados de ERO têm sido encontrados no sêmen de homens inférteis (Aitken *et al.*, 1991; Zini *et al.* 1993; Lewis *et al.* 1995), e estes têm sido correlacionados com a diminuição da morfologia do espermatozóide, como indicado por uma baixa proporção de espermatozóides com morfologia normal no sêmen (Gomez *et al.*, 1996). Em recente estudo, Nallella *et al.* (2005) mostraram forte correlação negativa entre qualidade seminal (derivada de parâmetros seminais) e níveis de ERO em todos os pacientes com fatores masculinos de infertilidade. A correlação aumenta significativamente com o aumento dos espermatozóides anormais e com a diminuição da motilidade (Aitken *et al.*, 1989). Isto vem de acordo com alguns pesquisadores que acreditam que as concentrações patológicas de ERO, detectadas no sêmen de homens inférteis, se devem mais provavelmente ao aumento da produção de ERO e não pela deficiência de enzimas antioxidantes no plasma seminal (Potts *et al.*, 2001; Zini *et al.*, 2000). Entretanto, outros estudos (Alkan *et al.* 1997; Lewis *et al.* 1995; Smith *et al.*, 1996), sugerem que EO deve ser resultado da deficiente capacidade antioxidante seminal, tendo em vista, que os níveis de superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) apresentaram correlação positiva com a concentração espermática e negativa com níveis de leucócitos

seminais, e estes últimos apresentaram correlação inversa com motilidade (Pasqualotto *et al.*, 2006).

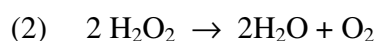
O espermatozóide possui poucos antioxidantes em seu citoplasma, tornando esta célula muito vulnerável aos danos causados pelas ERO. Felizmente, o plasma seminal é rico em antioxidantes, contribuindo, desta forma, para o equilíbrio entre produção e neutralização das ERO (Smith *et al.*, 1996; Lewis *et al.*, 1997).

Enzimas que neutralizam as ações das ERO incluem a SOD, a qual também é detectada em espermatozoides de diferentes espécies (Alvarez *et al.*, 1987; Meier & Habermehl, 1990), e que catalisa a reação de dois ânions superóxido com formação de H₂O₂ que é menos reativo e pode ser degradado por outras enzimas, como a catalase e a glutatona peroxidase, conforme reação 1.



Outra enzima que combate as ações prejudiciais do excesso de ERO é a CAT, a qual está presente no espermatozóide e plasma seminal humano, assim como no de outras espécies (Meier & Habermehl, 1990; Foote *et al.*, 2000).

Esta enzima catalisa a decomposição de peróxido de hidrogênio à água e oxigênio, de acordo com a reação 2:



Outras substâncias no sêmen podem, igualmente, agir como neutralizadoras das ERO. Proteínas como a albumina e pequenas moléculas, tais como a hipotaurina, taurina, piruvato e glutatona, podem proteger os tecidos contra o EO (Lewis *et al.*, 1997;

Mccall & Frei, 1999). Entretanto, o principal antioxidante no líquido seminal dos homens férteis é a vitamina C (ácido ascórbico), contribuindo com até 65% de sua capacidade antioxidante (Agarwal, 2004).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

1. Determinar se a infecção causada pelo papilomavírus humano apresenta correlação com qualidade seminal (concentração, motilidade e morfologia) e defesas antioxidantes enzimáticas (superóxido dismutase e catalase).

3.2 Objetivos específicos

2. Estudar a presença do vírus no sêmen de homens, cujas mulheres apresentam diagnóstico clínico e/ou citológico do papilomavírus humano;

3. Comparar as principais características seminais (concentração, motilidade e morfologia), com a presença de HPVs de alto risco oncogênico;

4. Avaliar a atividade da SOD e CAT nos pacientes HPV positivos de acordo com a classificação viral;

5. Correlacionar a morfologia espermática, segundo o critério estrito de Tygerberg e da OMS, com a atividade de catalase e superóxido dismutase;

6. Relacionar leucospermia com presença do vírus e com o tipo de HPV.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

O estudo desenvolveu-se de modo prospectivo, entre janeiro de 2006 e junho de 2007, em homens cujas parceiras foram atendidas no Ambulatório de Patologia do Trato Genital Inferior da Universidade de Caxias do Sul e apresentaram diagnóstico clínico e/ou citológico do papilomavírus humano.

Para que o paciente participasse do estudo, foi obtida a assinatura após leitura e esclarecimentos sobre o estudo do “Termo de Consentimento Livre e Esclarecido” (anexo B), seguida de entrevista para o preenchimento do instrumento de avaliação epidemiológica (anexo C).

Os experimentos contaram com a presença de 80 voluntários, que foram incluídos ou não no desenho experimental, de acordo com os seguintes critérios:

Critérios de inclusão:

- homens cujas parceiras apresentem diagnóstico clínico e/ou citológico do papilomavírus humano;
- relacionamento estável (acima de 6 meses);
- pacientes sem queixa de infertilidade;
- não uso de preservativo nas relações conjugais.

Critérios de exclusão:

- pacientes que tenham feito vasectomia;
- pacientes com azoospermia;
- pacientes submetidos a tratamento quimioterápico ou radioterápico.

Foram entrevistados 80 homens, parceiros de mulheres com diagnóstico clínico e/ou citológico de papilomavírus humano, dos quais 12 (15%) foram excluídos da pesquisa, sendo 3 (3,75%) por não apresentar todos os critérios necessários para inclusão e 9 (11,25%) por apresentar algum dos critérios de exclusão.

No intuito de facilitar a análise e compreensão dos resultados, a população estudada neste trabalho foi dividida em 4 grupos (figura 3), assim composto:

- grupo 1: constituído pelos pacientes HPV/DNA negativos;
- grupo 2: constituído pelos pacientes HPV/DNA positivos;
- grupo 3: constituído pelos pacientes HPV/DNA positivo tipos 16 ou 18;
- grupo 4: constituído pelos pacientes HPV/DNA positivos para outros tipos.

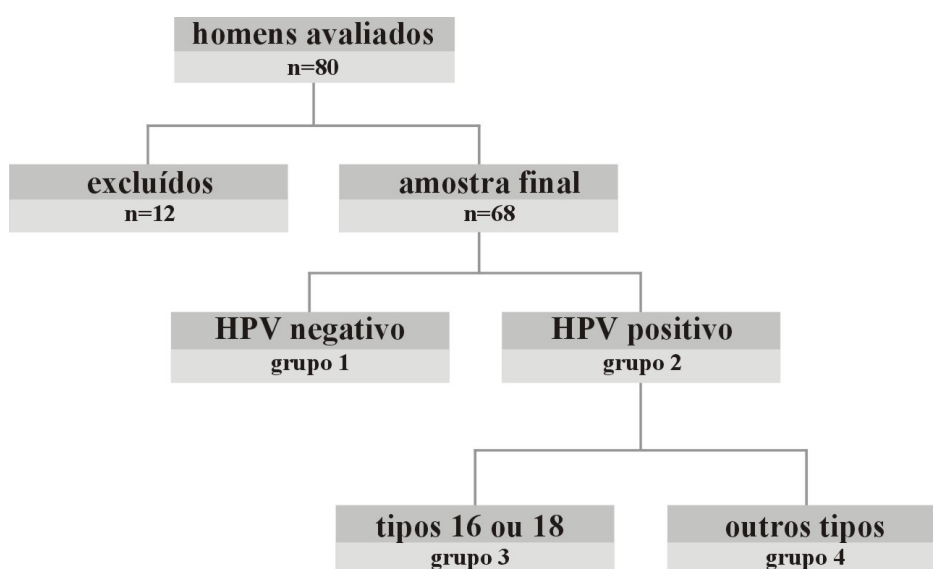


FIGURA 3: Fluxograma da classificação das amostras

Este estudo foi realizado com a apreciação e a provação do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade de Caxias do Sul.

4.1 Coleta de material

A amostra seminal foi coletada no ambulatório da Universidade de Caxias do Sul, em uma sala individual destinada para este uso.

Todas elas foram coletadas mediante masturbação, dentro de um recipiente plástico estéril, após um período de abstinência de 48-72 horas. Os parâmetros seminais e espermáticos foram avaliados de 30 a 60 minutos após a ejaculação, a temperatura de 37°C. O restante da amostra seminal foi centrifugada a 1500rpm por 10 minutos. O sobrenadante, contendo plasma seminal, foi aliqotado em dois eppendorfs de igual volume e armazenado a -80°C para avaliação dos marcadores do estresse oxidativo (SOD e CAT); já o sedimento, contendo os espermatozóides, foi aliqotado, acrescido de tampão PBS e armazenado a -20°C para avaliar a presença do HPV.

4.2 Métodos

4.2.1 Avaliação macroscópica do sêmen

A avaliação macroscópica do ejaculado foi realizada no sentido de avaliar os seguintes aspectos: cor, volume, viscosidade, liquefação e pH. O volume do ejaculado foi medido por aspiração de toda a amostra com o auxílio de uma pipeta graduada acoplada a um pipetador eletrônico. As amostras foram acondicionadas em uma estufa, a temperatura de 37°C, por 30 minutos, para que se procedesse à liquefação seminal antes da avaliação da concentração espermática e de outros parâmetros.

4.2.2 Avaliação microscópica do sêmen

4.2.2.1 Determinação da concentração e motilidade espermática

Após misturar cuidadosamente a amostra seminal por completo, com o auxílio de um aparelho homogenizador de amostras (vórtex), as mesmas foram avaliadas manualmente pelo pesquisador. Foi utilizada uma fita de pH para avaliar o pH da amostra seminal. Para determinação da concentração e motilidade espermáticas, uma alíquota liquefeita de 5 μ L foi inserida na câmara de contagem “Makler”, até seu preenchimento integral, com o auxílio de uma pipeta de pressão positiva. Estas amostras foram analisadas com o uso de um microscópio óptico equipado com uma objetiva de contraste de fase de 20X e uma magnificação de 200X.

4.2.2.2 Determinação da morfologia do espermatozóide

De acordo com a classificação do critério estrito de Tygerberg, um espermatozóide é considerado normal quando sua cabeça possui configuração oval, absolutamente perfeita, com um acrossômo bem definido, abrangendo cerca de 40-70% da porção cefálica do espermatozóide (Kruger *et al.*, 1988). As cabeças com formato limítrofe são consideradas anormais. O comprimento das cabeças normais para espermatozóides corados é de 5-6 μ m e a largura de 2,5-3,5 μ m. Não deve haver nenhuma anormalidade na peça intermediária ou na cauda. A peça intermediária deve ser delgada, anexada à parte central do corpo e com menos de 1 μ m de largura, enquanto seu comprimento deve ser de aproximadamente uma vez e meia a da cabeça. A inclusão citoplasmática não poderá ser maior do que a metade da porção cefálica do espermatozóide, enquanto a cauda deve ser

uniforme, ligeiramente mais fina que a peça intermediária, com aproximadamente 45 μm e não poderá ser em espiral.

Foram preparados dois esfregaços de cada amostra em lâminas de microscopia, para serem fixados e corados pelo método de coloração Panótico do hemograma.

Pelo menos quatro áreas de diferentes campos foram analisadas em cada esfregaço. A avaliação foi feita por meio da utilização de objetivas de imersão com óleo anti-dissipador de fluorescência de alta qualidade (X 1000). Os espermatozóides foram classificados como formas normais ou anormais. Quando houve alguma dúvida quanto ao comprimento ou largura dos espermatozóides, os mesmos foram medidos com o auxílio de um micrômetro ocular. As lâminas foram analisadas segundo os critérios da OMS e o critério estrito de Tygerberg.

4.2.2.3 Avaliação da leucospermia

A presença de leucócitos granulócitos nas amostras seminais foi avaliada pelo teste de Endtz (Shekarriz *et al.*, 1995). Este teste é baseado no fato de que os leucócitos presentes na amostra seminal coram-se de marrom-escuro, ou seja, são células peroxidase-positivo.

Para realização do teste, um volume de 20 μL de sêmen liquefeito foi colocado em um tubo de criopreservação de 1,2mL. A este foi adicionado 20 μL de solução tampão de fosfato (PBS) e 40 μL de solução de benzidina. A solução foi agitada e deixada a temperatura ambiente por 5 minutos.

As células peroxidase-positivo foram contadas em todos os 100 quadrados do retículo da câmara de Makler com uma objetiva de 10X de magnificação. Os resultados foram anotados como células contadas $\times 10^6/\text{mL}$. Resultados de leucospermia superiores a $1 \times 10^6/\text{mL}$ foram considerados anormalmente elevados.

4.2.3 Análise da presença do vírus do HPV nos espermatozóides

4.2.3.1 Extração de DNA

A extração do DNA foi feita utilizando o kit comercial *Wizard Genomic DNA Purification Kit* (Promega), seguindo orientações do fabricante. A solução obtida, que contém DNA extraído, foi estocada a -20°C , até ser utilizada na reação de amplificação.

4.2.3.2 Amplificação da β -globina e do HPV-PCR genérico

As amostras de DNA, obtidas a partir da metodologia de extração, foram amplificadas com oligonucleotídeos denominados PCO4 e GH20, que são os segmentos do gene da β -globina humana (fragmentos de amplificação, de aproximadamente, 270 pares de bases) para garantir a qualificação e quantificação do DNA humano. Para a amplificação do HPV, foram utilizados oligonucleotídeos específicos (PGMY09 e PGMY11) que amplificam a região L1 viral, altamente conservada (fragmentos de amplificação, de aproximadamente, 450 pares de bases) que identificam a presença do vírus HPV-PCR genérico e foram usados como primers externos, conforme descrito por Gravitt *et al.* (2000), anexo A.

As reações de amplificação foram realizadas com volume final de 13,0µL contendo 8,75 µL de PCR Master Mix (Promega), 2,462 µL de água livre de nuclease, 0,368 µL dos primers PCO4 [25µM] e GH20 [25µM], 0,276 µL dos primers PGMY09 [20µM] e PGMY11 [20µM] e 0,5 µL de DNA. O controle positivo tratou-se da amplificação de uma amostra HPV positiva, previamente tipada pelo laboratório de biologia molecular desta universidade e o controle negativo, a reação sem DNA.

A amplificação foi realizada em termociclador *PTC-100® Peltier Thermal Cycler*. O programa de PCR constituiu das seguintes etapas: 5 minutos a 95°C, seguido de 40 ciclos de 1 minuto a 95°C para desnaturação do DNA, 1 minuto a 52°C para anelamento dos primers e 1 minuto a 72°C para alongamento. Ao final dos 40 ciclos, foi realizada uma extensão suplementar a 72°C, por 5 minutos.

4.2.3.3 Separação e análise dos segmentos amplificados

Posteriormente à amplificação, 8 µL do produto de PCR e dos controles positivo e negativo foram acrescidos de 2 µL de tampão de bromofenol (0,25% de bromofenol blue; 40% de sacarose; qsp 100mL água MiliQ) e aplicados em gel de poliacrilamida a 20%, que foi submetido a corrida eletroforética em cuba vertical a 110 Volts e 70mA durante 35 minutos. Como marcador de peso molecular foi utilizado *PGEM (Bench Top pgem ®)*. O tampão utilizado para a corrida de eletroforese foi TBE 1,0X.

O gel foi revelado da seguinte maneira: imersão em solução fixadora por 5 minutos (15mL etanol, 1mL ácido acético, qsp 150mL água destilada), adição de 0,3g de nitrato de prata por 10 minutos, lavagem com água destilada por 30 segundos, imersão em solução de revelação (4,5g de NaOH, 0,5mL de formaldeído, qsp 150mL de água) por 10

minutos e retorno a solução fixadora por mais 5 minutos. Todas estas etapas foram realizadas sob agitação constante, no agitador de Klein.

Os resultados foram analisados com base no marcador de peso molecular e a reação foi validada a partir dos controles positivo e negativo.

4.2.3.4 Amplificação HPV por nested -PCR

O produto de amplificação do HPV-PCR genérico foi submetido à técnica de nested PCR para detecção de HPV/DNA, através do uso de oligonucleotídeos específicos internos (GP05+ e GP06+) que amplificam a região viral L1, gerando fragmento de amplificação de, aproximadamente, 150 pares de bases, conforme metodologia descrita por Husman *et al.* (1995), podendo ser capaz de detectar vários tipos de HVP, entre eles: 6, 11, 13, 16, 18, 30, 31, 32, 33, 39, 40, 43, 45, 51, 54, 55, 56, 59 e 66. As seqüências de bases estão descritas no anexo A.

A reação de amplificação do nested foi realizada em volume final de 14,506 µL, contendo 7,0 µL de PCR Master Mix (Promega), 5,35 µL de água livre de nuclease, 0,328µL do primer GP05+ [20µM], 0,328 µL do primer GP06+ [20µM] e 1,5 µL do produto do primeiro PCR.

A amplificação do nested foi realizada em termociclador *PTC-100® Peltier Thermal Cycler*. O programa de PCR constituiu das seguintes etapas: 5 minutos a 94°C, seguido de 30 ciclos de 1 minuto a 94°C para desnaturação do DNA, 2 minutos a 40°C para anelamento dos primers e 1 minuto e 30 segundos a 72°C para alongamento. Ao final dos 30 ciclos, foi realizada uma extensão suplementar a 72°C por, 7 minutos.

A separação e visualização dos segmentos amplificados seguiram as mesmas condições descritas para a avaliação da β -globina e do HPV-PCR genérico.

4.2.3.5 Detecção do HPV 16 e HPV 18

As amostras de DNA, obtidas a partir da metodologia de extração e confirmadas para presença de DNA - humano, foram submetidas à técnica de nested PCR para detecção de HPV/DNA tipo 16 e 18, através do uso de oligonucleotídeos específicos que amplificam a região viral E6/E7 altamente conservada destes HPVs.

Para o HPV 16, foram utilizados os primers externos (nucleotídeos 419-438 e 637-656), o qual apresenta fragmento de amplificação de, aproximadamente, 237 pares de bases, e os primers internos (nucleotídeos 493-512 e 606-625), tendo fragmento de amplificação de, aproximadamente, 132 pares de bases; enquanto que, para o HPV 18, foram usados primers externos (nucleotídeos 426-445 e 674-693), com fragmento de amplificação de, aproximadamente, 267 pares de bases, e primers internos (nucleotídeos 492-511 e 596-615) apresentando fragmento de amplificação de, aproximadamente, 123 pares de bases. Conforme metodologia descrita por Ishikawa *et al.* (2003), as seqüências de bases estão descritas no anexo A.

4.2.3.6 Amplificação HPV 16 por nested-PCR

A primeira reação de amplificação foi realizada com volume final de 19,55 μ L, contendo 12,5 μ L de PCR Master Mix (Promega), 5,5 μ L de água livre de nuclease, 0,525 μ L do primer 419-438 [20 μ M], 0,525 μ L do primer 637-656 [20 μ M] e 0,5

μL de DNA. Como controle positivo, foi usada uma amostra previamente identificada, contendo unicamente o HPV 16 e, como controle negativo, a reação sem DNA.

A amplificação desta reação foi realizada em termociclador *PTC-100® Peltier Thermal Cycler*. O programa de PCR constituiu das seguintes etapas: 5 minutos a 95°C , seguido de 30 ciclos de 1 minuto a 95°C para desnaturação do DNA, 1 minuto a 54°C para anelamento dos primers e 1 minuto a 72°C para alongamento. Ao final dos 30 ciclos, foi realizada uma extensão suplementar a 72°C , por 5 minutos.

A reação de amplificação do nested foi realizada em volume final de $20,05\mu\text{L}$, contendo $12,5\mu\text{L}$ de PCR Master Mix (Promega), $6,0\mu\text{L}$ de água livre de nuclease, $0,525\mu\text{L}$ do primer 493-512 [$20\mu\text{M}$], $0,525\mu\text{L}$ do primer 606-625 [$20\mu\text{M}$] e $0,5\mu\text{L}$ do produto do primeiro PCR.

A amplificação do nested foi realizada em termociclador *PTC-100® Peltier Thermal Cycler*. O programa de PCR constituiu das seguintes etapas: 5 minutos a 95°C , seguido de 30 ciclos de 1 minuto a 95°C para desnaturação do DNA, 1 minuto a 58°C para anelamento dos primers e 1 minuto a 72°C para alongamento. Ao final dos 30 ciclos, foi realizada uma extensão suplementar a 72°C , por 5 minutos.

Para separação e análise dos segmentos amplificados, usou-se gel de Poliacrilamida 20% revelado com prata, conforme descrito anteriormente.

4.2.3.7 Amplificação HPV 18 por nested-PCR

A amplificação do HPV 18 por nested-PCR foi realizada nas mesmas condições descritas para a detecção de HPV 16 por nested-PCR. Como controle positivo, foi usada uma amostra previamente identificada, contendo unicamente o HPV 18.

Na reação do HPV 18, foram usados os primers externos 426-445 [20 μ M] e 674-693 [20 μ M] que gerou um produto de amplificação de 267pb e, na segunda etapa, os primers internos 492-511 [20 μ M] e 596-615 [20 μ M] resultando num produto de amplificação de 123pb.

4.2.4 Mensuração dos níveis de superóxido dismutase e catalase

4.2.4.1 Determinação da atividade da enzima superóxido dismutase

A atividade da enzima superóxido dismutase foi medida em espectrofotômetro, segundo metodologia descrita por Bamister & Calabrese (1987).

Para medir a atividade enzimática, alíquotas de 100, 50 e 20 μ L de plasma seminal foram adicionadas a tampão glicina (50mM; pH 10,2), completando o volume para 2mL. A esse foram adicionados 34 μ L de bitartarato de adrenalina (60mM) e medida a absorbância a 480nm. Os resultados foram expressos em U/mg de proteína, sendo que, uma unidade de SOD, pode ser definida como a quantidade de enzima que inibe em 50% a velocidade de oxidação da adrenalina.

4.2.4.2 Determinação da atividade da enzima catalase

A determinação da catalase baseia-se na medida da velocidade de consumo do H₂O₂ na amostra estudada. A atividade da CAT foi medida conforme metodologia descrita por Aebi (1984).

Para tanto, 20 μ L de plasma seminal foi adicionado 70 μ L de peróxido de hidrogênio (0,3M) e tampão fosfato (pH 7,0) até 3mL. A velocidade de decomposição do

H₂O₂ foi medida com o espectrofotômetro a 240nm, durante 60 segundos, com intervalo de 20 segundos. Para o cálculo da concentração de catalase, foi utilizado o coeficiente de extinção molar de 0,071mM⁻¹ cm⁻¹. Os resultados foram expressos em U/ mg de proteína (μmol H₂O₂/mg de proteínas/ min).

4.2.4.3 Determinação das proteínas totais

A determinação de proteínas totais foi realizada pelo método do biureto, através do Kit “Sensiprot de proteínas totais” (LABTEST). Os valores foram expressos em mg/dL de proteínas. Os resultados foram utilizados no cálculo da atividade de SOD e CAT.

4.3 Análise estatística

Os dados obtidos neste trabalho foram submetidos à análise estatística pelo programa *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS) versão 11.5.

Para análise estatística foram utilizados os testes descritivos, teste T, χ^2 Qui-Quadrado (*Chi-square*) e Pearson.

Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos estatisticamente.

4.4 FLUXOGRAMA DA METODOLOGIA

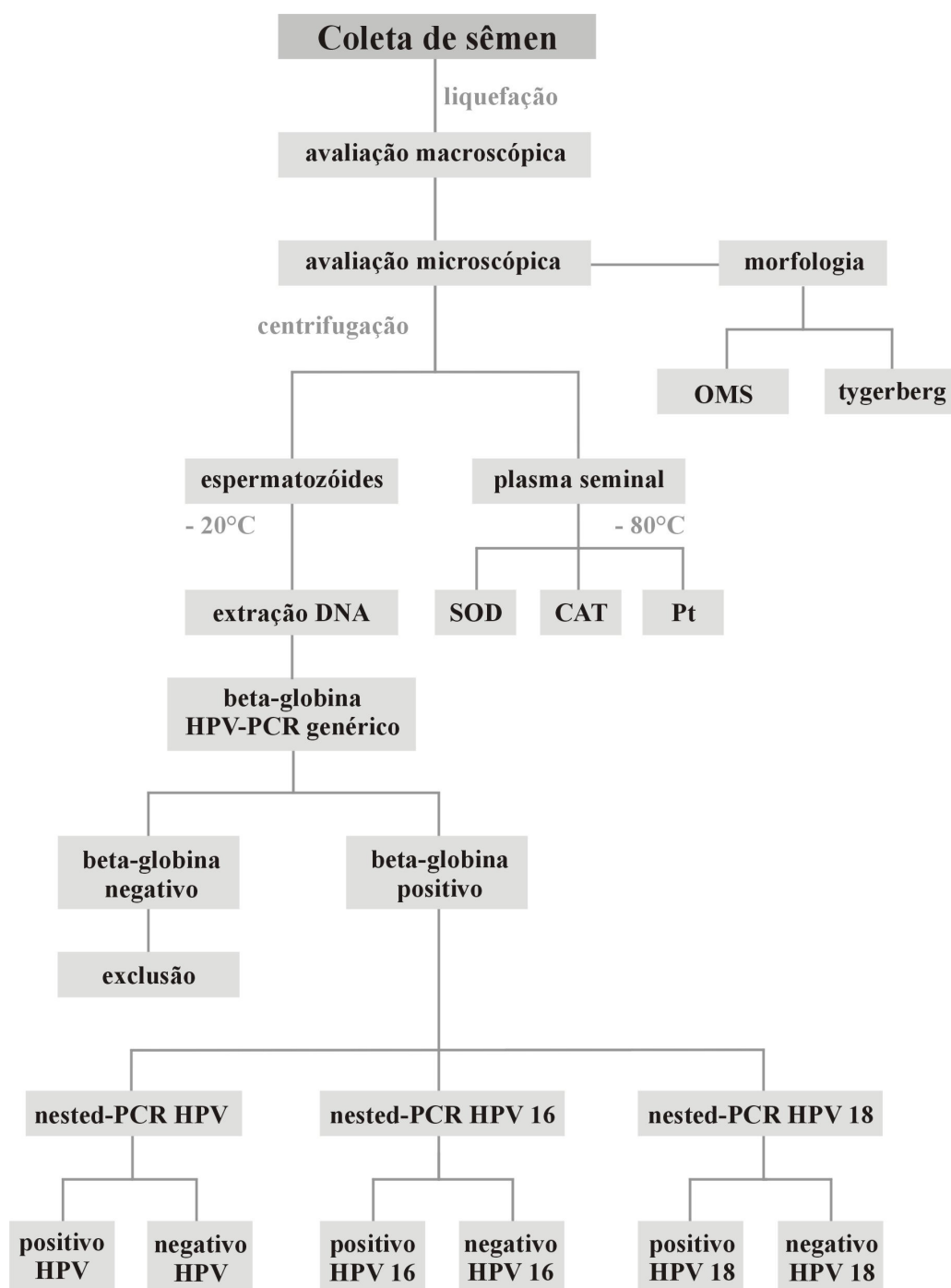


FIGURA 4: Fluxograma da metodologia

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

No material em estudo, a identificação do DNA - humano foi realizada pela amplificação de um segmento de 270 pares de bases do gene da β -globina humana, sendo 100% positivo, o que garantiu a qualificação e quantificação do DNA para análise do HPV, descartando, assim, a possibilidade de resultados falso-negativos de HPV por causa da grande quantidade de inibidores de PCR presentes no sêmen (Martin *et al.*, 1993). A análise da amplificação do gene da β -globina humana pode ser observado na figura 5.

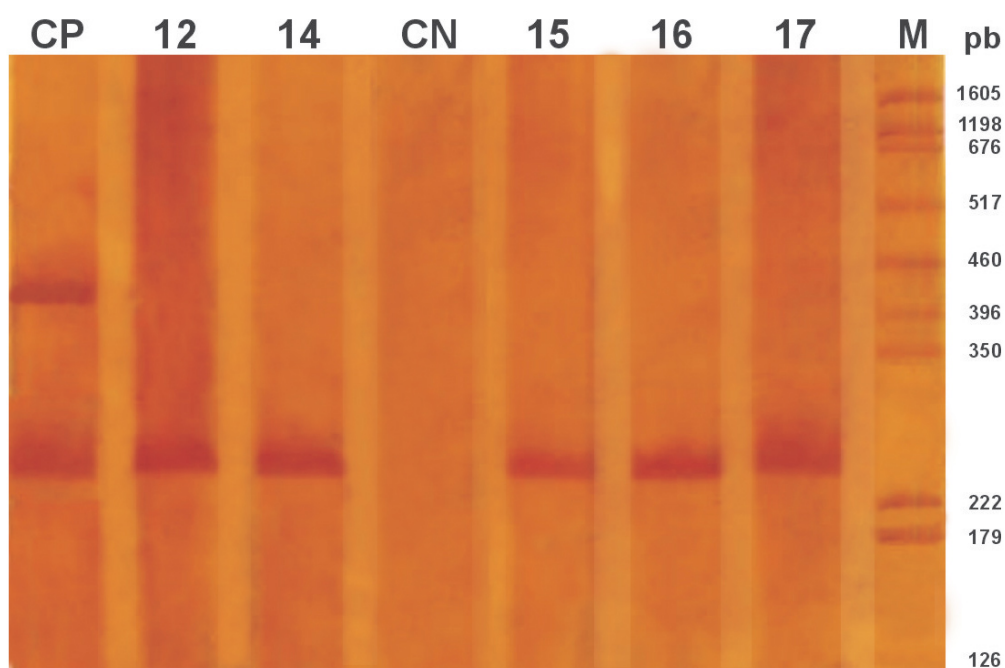


FIGURA 5: Amplificação do gene da β -globina humana e HPV-PCR genérico (CP: controle positivo; CN: controle negativo; M: marcador de peso molecular; amostras :12,14,15,16 e 17 positivas para β -globina humana).

Das 68 amostras analisadas, 30 (44,1%) foram positivas para HPV/DNA, das quais 8/68 (11,8%) foram positivos para HPV/DNA de alto risco oncogênico, sendo 6 casos (8,8%) do tipo 16, 2 casos (2,9%) do tipo 18 e os outros 22 casos (32,4%) referente a outros tipos de HPV. As demais amostras, 38/68 (55,9%), foram negativas para HPV/DNA.

A caracterização da amostra, incluindo a distribuição dos principais tipos de HPV de alto risco oncogênico, está demonstrada na figura 6.

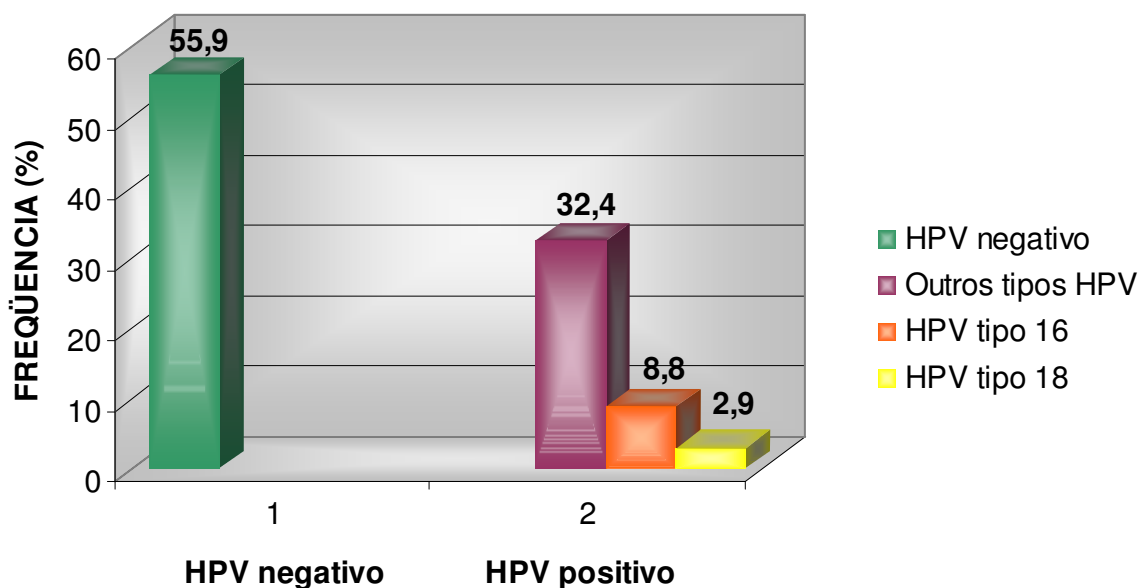


FIGURA 6: Caracterização da amostra, considerando o tipo viral

Os resultados do presente trabalho corroboram os dados encontrados na literatura que referem uma positividade 2,2% - 82,9% para HPV em amostras de sêmen (Dunne *et al.*, 2006), estando o tipo 16 constituído entre os mais comuns.

O HPV/DNA foi encontrado em amostras seminais testadas por PCR, estando presente em 26,6% (Giovanelli *et al.*, 2007) e 82,9% (Astori *et al.*, 1995) dos parceiros sexuais de mulheres com HPV, em 53% dos homens entre 20 a 41 anos, com história clínica, atual ou passada, de infecção por esta doença e 8% de positividade em doadores de sêmen saudáveis (Olatunbosun *et al.*, 2001) e em 20% dos homens estudados em 76 famílias (Rintala *et al.*, 2005). Estudo realizado na Finlândia com 65 voluntários, futuros pais, encontrou 15,4% das amostras de sêmen positivas para HPV de alto risco oncogênico, usando a técnica de nested PCR (Rintala *et al.*, 2004).

Mesmo sendo confirmado por dados da literatura, é necessário enfatizar que esta prevalência de 44,1% representa uma parcela grande de homens infectados que não estão sendo diagnosticados, justamente pelo fato de que a maioria das infecções por HPV na genitália masculina são assintomáticas e inaparentes, podendo tornar-se transitórias ou mesmo indetectáveis com o passar do tempo, permitindo ao vírus se difundir silenciosamente. O que reforça a hipótese que a infecção por HPV em homens seja responsável por sustentar a transmissão para as parceiras mulheres e pela perpetuação da infecção na população, devido a sua natureza, podendo ser o sêmen o vetor desta transmissão, até mesmo para os fetos (Lai *et al.*, 1996).

Portanto, o uso de técnicas de biologia molecular é uma boa estratégia para o diagnóstico da infecção por HPV em homens, conforme já sugerido por outros autores (Nicolau *et al.*, 2005) e reforçado por este trabalho.

As figuras 7, 8 e 9 ilustram os resultados da amplificação do DNA viral em gel de poliacrilamida.

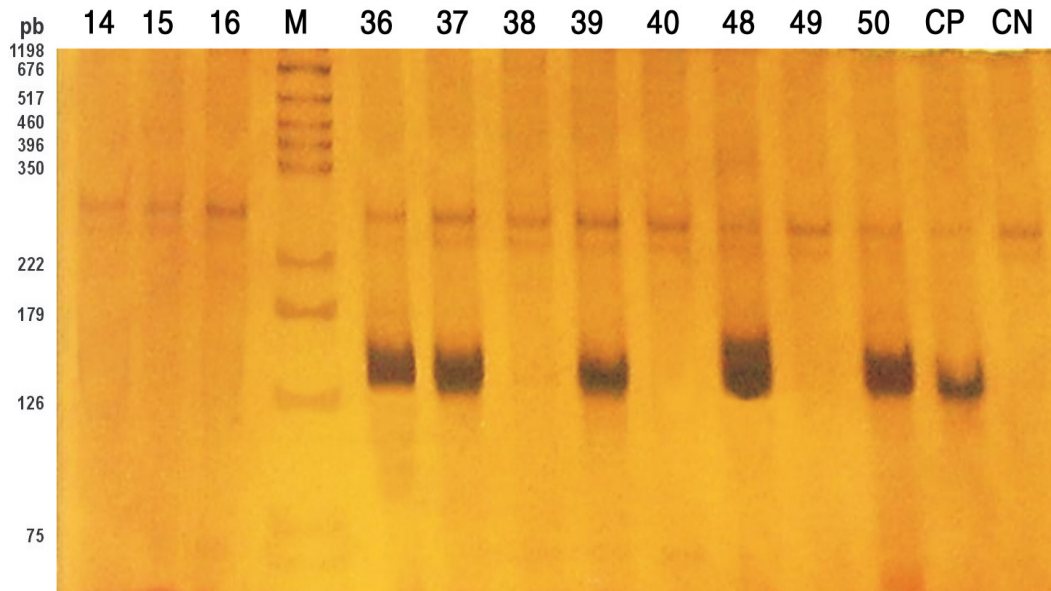


FIGURA 7: Amplificação do nested HPV-PCR GP05+/GP06+ (CP: controle positivo; CN: controle negativo; M: marcador de peso molecular; amostras 14, 15, 16, 38, 40 e 49: HPV negativas; amostras 36, 37, 39, 48 e 50: HPV positivo).

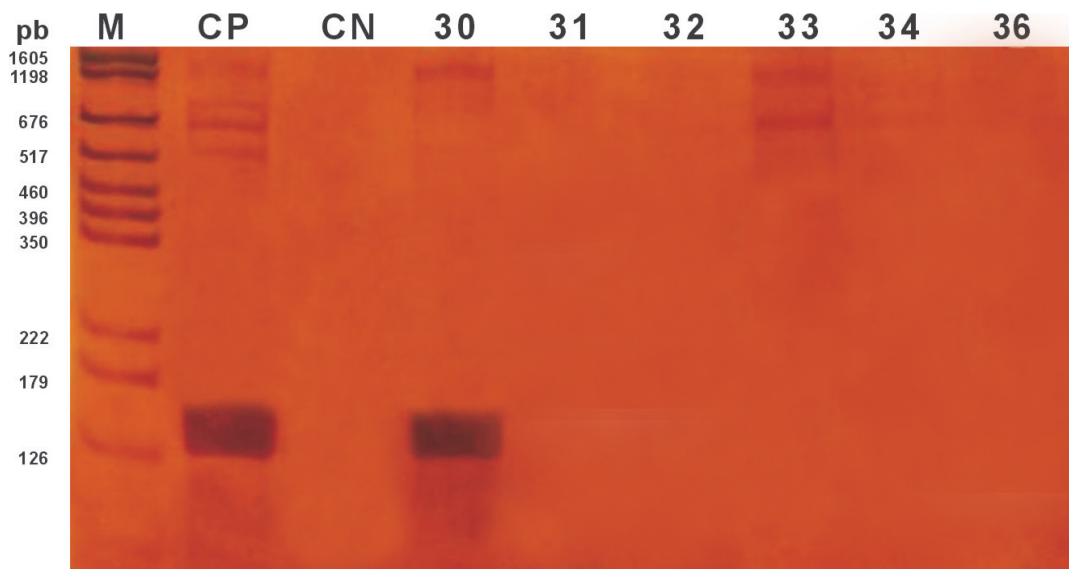


FIGURA 8: Amplificação do nested HPV 16
 (CP: controle positivo; CN: controle negativo; M: marcador de peso molecular; amostras 31, 32, 33, 34 e 36: HPV 16 negativas; amostra 30: HPV 16 positivo).

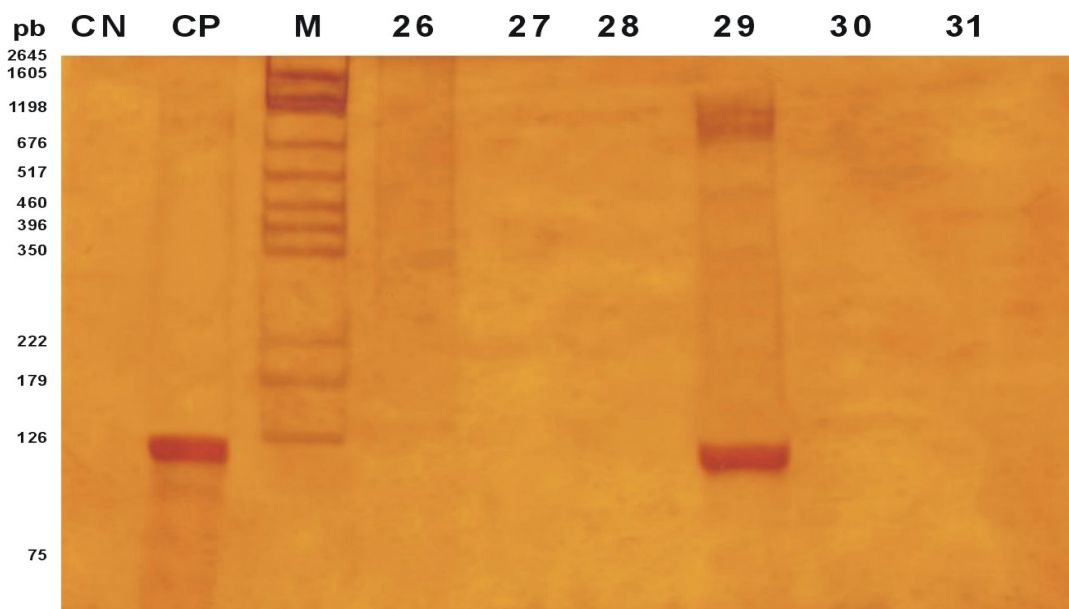


FIGURA 9: Amplificação do nested HPV 18
 (CP: controle positivo; CN: controle negativo; M: marcador de peso molecular; amostras 26, 27, 28, 30 e 31: HPV 18 negativas; amostra 29: HPV 18 positivo).

Pesquisas epidemiológicas de infecção por HPV mostram o papel essencial da infecção masculina no sentido da transmissão da doença (Skerlev *et al.*, 2002). Os homens apresentam menor probabilidade de terem infecção persistente, porém ainda não foi bem determinado se esta observação é devido a menor incidência ou mais curta duração da infecção em homens versus mulheres (Partridge & Koutsky, 2006).

As tabelas 1, 2 e 3 descrevem os dados epidemiológicos da população estudada, comparando os grupos HPV/DNA positivo e negativo em relações às variáveis analisadas, a partir dos dados contidos nas fichas de avaliação respondidas no momento da coleta da amostra (Anexo C).

No grupo HPV/DNA positivo, constituído por 30 homens, a média de idade foi de $30,27 \pm 7,57$ anos (20 - 43 anos) e no grupo HPV/DNA negativo a média de idade foi de $30,26 \pm 9,23$ anos (19 - 67 anos). Ao realizarmos a comparação entre a média de idade dos grupos 1 e 2 não foi observada diferença significativa, como também pode ser notado pela análise dos diferentes níveis de faixas etárias (tabela 1). Portanto, na população estudada, não foi observada relação entre a presença do vírus e a idade dos pacientes.

Estudos anteriores mostram resultados divergentes ao associar a idade do paciente à infecção por HPV. Rombaldi *et al.* (2006), ao estudar uma população de 99 homens, parceiros sexuais de mulheres com neoplasia intra-epitelial cervical (NIC), que foram avaliados no ambulatório da Universidade de Caxias do Sul, não encontraram relação entre HPV e idade. Franceschi *et al.* (2002), ao realizar estudo do tipo caso-controle entre 1985-1993, em cinco países, incluindo o Brasil, também não apontaram uma associação entre idade e infecção pelo HPV. Entretanto, Koutsky (1997) observou que a infecção por HPV possui uma prevalência superior em homens entre 18-28 anos de idade. Svare *et al.* (2002) encontraram diminuição do risco de HPV com o aumento da idade,

sendo a aquisição do HPV muito comum, particularmente entre adultos jovens sexualmente ativos (Franco *et al.*, 1999).

Na avaliação do nível de ensino, deste estudo, não foi observado relação entre o grau de escolaridade e a infecção pelo vírus HPV (tabela 1). É importante salientar que a população estudada era proveniente do sistema único de saúde (SUS) e, até certo ponto, homogênea (nenhum dos pacientes era analfabeto e 72% deles tinha entre 1º grau completo e 2º grau completo). Apesar deste nível de instrução ser considerado relativamente bom, uma grande parcela dos homens não possuía informação adequada sobre a doença no que tange as formas de transmissão e prevenção.

Isto corrobora os achados de Castro *et al.* (1994), os quais realizaram estudo no Rio de Janeiro e encontraram 45% dos casos de HPV positivos com grau de instrução de ensino médio. Castellsagué *et al.* (2002), em estudo multicêntrico, encontraram 39,6% para nível fundamental e 19,5% para nível médio ou superior. Outros dois estudos não acharam associação entre infecção por HPV e nível de educação (Franceschi *et al.* 2002; Svare *et al.*, 2002).

Analisando a história de doenças prévias, o presente trabalho não indicou associação significativa entre os grupos HPV positivo (53,3%) e HPV negativo (44,7%), conforme mostrado na tabela 1. Quando analisamos apenas as doenças sexualmente transmissíveis, encontramos um percentual de 46,6% e 34,2% para os grupos HPV positivo e negativo, respectivamente, permanecendo não significativa esta relação, muito embora a presença de DST anteriores seja considerada um importante fator de risco para aquisição do HPV, conforme mostram alguns estudos (Hippelainen *et al.*, 1993; Castellsague *et al.* 1997). Por outro lado, alguns pesquisadores, igualmente, não encontraram associação (Rombaldi *et al.*, 2006).

TABELA 1: Dados epidemiológicos de parceiros sexuais de mulheres portadoras de HPV

VARIÁVEIS	CATEGORIA	HPV/DNA NEGATIVO		HPV/DNA POSITIVO		VALOR p*
		n=38		n= 30		
		n	%	n	%	
idade	≤ 24 anos	10	26,3	10	33,3	
	25 a 29 anos	12	31,6	6	20,0	
	30 a 34 anos	7	18,4	5	16,7	
	35 a 39 anos	3	7,9	4	13,3	
	≥ 40 anos	6	15,8	5	16,7	NS
	média em anos	30,26 ± 9,29		30,27 ± 7,57		NS
escolaridade	1º grau incompleto	7	18,4	9	30,0	
	1º grau completo	12	31,6	7	23,3	
	2º grau incompleto	4	10,5	6	20,0	
	2º grau completo	14	36,8	6	20,0	
	3º grau incompleto	-	-	2	6,7	
	3º grau completo	1	2,6	-	-	NS
	doenças prévias	gonorréia	6	15,8	9	30,0
hepatite	2	5,3	1	3,3		
HIV	1	2,6	-	-		
HPV	3	7,9	3	10,0		
lues	1	2,6	1	3,3		
outras **	4	10,5	2	6,7		
nenhuma	21	55,3	14	46,7	NS	
número de filhos	0	12	31,6	10	33,3	
	1	15	39,5	11	36,7	
	2	8	21,1	4	13,3	
	3	1	2,6	4	13,3	
	4	1	2,6	1	3,3	
	6	1	2,6	-	-	NS

* Teste Qui-quadrado: Foi considerado estatisticamente significante $p < 0,05$.

NS: associação estatisticamente não significativa.

** outras doenças: caxumba, rubéola, sarampo, varíola, diabetes ou doenças respiratórias.

A variável número de filhos apresentou uma distribuição uniforme entre os grupos, portanto, no presente estudo, esta variável não pode ser associada com a infecção pelo vírus HPV (tabela 1).

TABELA 2: Hábitos de parceiros sexuais de mulheres com HPV

VARIÁVEIS	CATEGORIA	HPV/DNA NEGATIVO n=38		HPV/DNA POSITIVO n= 30		VALOR p*
		n	%	n	%	
Tabagismo	sim	17	44,7	10	33,3	NS
	não	21	55,3	20	66,7	
Consumo de café	sim	21	55,3	14	46,7	NS
	não	17	44,7	16	53,3	
Consumo de bebida a base de cola	sim	4	10,5	6	20,0	NS
	não	34	89,5	24	80,0	
Alcoolismo	sim	5	13,2	4	13,3	NS
	não	33	86,8	26	86,7	
Consumo de chimarrão	sim	16	42,1	10	33,3	NS
	não	22	57,9	20	66,7	
Uso de drogas	sim	7	18,4	7	23,3	NS
	não	31	81,6	23	76,7	

* Teste Qui-Quadrado. Foi considerado estatisticamente significante $p < 0,05$.
NS: associação estatisticamente não significativa.

Neste trabalho nenhuma das variáveis referentes aos hábitos dos pacientes apresentou associação significativa com o HPV (tabela 2), apesar de algumas destas variáveis já terem sido relacionadas à presença do HPV em estudos prévios, bem como estarem entre os fatores de risco para aquisição da infecção. Um exemplo disto é o hábito de fumar, o qual foi associado positivamente com a infecção por HPV (Hippelainen *et al.* 1993; Wang *et al.*, 2003), assim como pacientes ex-fumantes apresentarem associação significativa com HPV (Rohan *et al.*, 1991). Por outro lado, outros dois estudos não encontraram associação entre tabagismo e HPV (Franceschi *et al.*, 2002; Svare *et al.*, 2002).

TABELA 3: Características da vida sexual de parceiros de mulheres com HPV

VARIÁVEIS	CATEGORIA	HPV/DNA NEGATIVO		HPV/DNA POSITIVO		VALOR p*
		n=38		n= 30		
		n	%	n	%	
Duração do atual relacionamento	média em anos	8,07 ± 8,47		5,25 ± 4,94		0,091
Nº parceiras extra-conjugais nos últimos 24 meses	0	18	54,5	18	64,3	NS
	1	4	12,1	2	7,1	
	2	8	24,2	1	3,6	
	3	1	3,0	2	7,1	
	4	2	6,1	2	7,1	
Frequência do uso de preservativo nas relações extra-conjugais	sempre	5	33,3	3	30,0	NS
	as vezes	5	33,3	5	50,0	
	nunca	3	20,0	1	10,0	
	não sabe	2	13,3	1	10,0	
Função sexual alterada	sim	2	5,3	4	13,3	NS
	não	36	94,7	26	86,7	

* Teste Qui-Quadrado. Foi considerado estatisticamente significante $p < 0,05$.

NS: associação estatisticamente não significativa.

Na análise da duração do atual relacionamento, foi possível observar um direcionamento, estatisticamente não significativo, a um relacionamento mais curto ($5,25 \pm 4,94$ anos) no grupo HPV positivo, quando comparado ao grupo HPV negativo ($8,07 \pm 8,47$ anos), conforme indicado na tabela 3. Na consulta à literatura, constatou-se que esta variável não foi anteriormente descrita; no entanto, nossos dados reforçam a idéia de que o aumento no número de parceiras sexuais tende a aumentar o risco de infecção por HPV. Castellsague *et al.* (1997) sugeriram que os fatores de risco para HPV em homens são similares aos encontrados para mulheres, estando relacionados com o comportamento sexual, assim como múltiplos parceiros sexuais, DST anterior e não uso de preservativo (Hippelainen *et al.* 1993).

Por outro lado, neste estudo, o número de parceiros extra-conjugais nos últimos 24 meses, assim como o uso de preservativo, não apresentaram associação com infecção por HPV (tabela 3).

Como esperado, tendo em vista a idade dos pacientes, a maioria não apresentou alteração na função sexual, independente da presença ou ausência do vírus (tabela 3).

Acreditamos que o tamanho amostral (68) seja pequeno para chegarmos a uma definição em relação ao perfil epidemiológico da população infectada, sendo necessária a futura ampliação do estudo.

TABELA 4: Avaliação das principais características seminais de cada grupo

VARIÁVEIS SEMINAIS	HPV/DNA NEGATIVO		HPV/DNA POSITIVO						Valor p*	Valor p*	Valor p*	Valor p*
	n=38 (1)		total n=30 (2)		tipo 16 ou 18 n=8 (3)		outros tipos n=22 (4)					
	média	Dp	média	Dp	média	Dp	média	Dp				
Volume (mL)	2,5	1,1	2,7	1,4	2,3	1,4	2,8	1,4	NS	NS	NS	NS
Concentração (x10 ⁶ /mL)	59,2	35,3	50,3	36,5	43,7	40,7	52,5	35,7	NS	NS	NS	NS
Motilidade (%)	59,9	24,0	58,8	22,8	51,7	21,2	61,6	23,4	NS	NS	NS	NS
Tygerberg (%)	4,3	3,1	2,6	1,9	3,2	1,5	2,3	2,0	0,007	NS	0,011	NS
Normal	11,9	7,9	8,1	4,3	9,0	4,0	7,8	4,5	0,017	NS	0,032	NS
Amorfo	55,2	11,6	57,3	13,4	53,9	10,9	58,6	14,2	NS	NS	NS	NS
Cauda dupla	1,1	1,2	0,9	1,5	1,0	1,7	0,9	1,5	NS	NS	NS	NS
Cauda quebrada	25,2	10,9	24,8	13,6	28,2	11,8	23,5	14,2	NS	NS	NS	NS
Gota citoplasmática	3,7	3,4	4,3	3,9	3,9	3,9	4,4	3,9	NS	NS	NS	NS
Macrocefalia	0,7	0,9	0,6	0,6	1,0	0,8	0,4	0,6	NS	NS	NS	0,048
Afilado	1,1	1,9	2,6	3,9	1,9	2,6	2,9	4,4	0,065	NS	0,084	NS
Piriforme	1,0	1,3	1,3	1,9	1,1	1,5	1,4	2,1	NS	NS	NS	NS

* Teste T. Foi considerado estatisticamente significante p<0,05.

NS: associação estatisticamente não significativa.

Na análise dos parâmetros seminais, podemos observar que medidas de volume, concentração e motilidade, parecem não sofrer alterações significativas em vista da presença do vírus HPV nos espermatozóides, apesar da diminuição dos parâmetros concentração e motilidade no grupo de pacientes portadores de HPV de alto risco oncogênico (grupo 3). Ao analisarmos a morfologia dos espermatozóides, tanto pelo critério estrito de Tygerberg como pelo critério da OMS, observamos que existe uma piora na qualidade dos espermatozóides nos pacientes HPV positivo comparados aos pacientes HPV negativos (tabela 4).

O mecanismo pelo qual o HPV infecta as células espermáticas ainda não foi determinado e também não se sabe se está relacionado à presença de receptores na superfície celular. Por outro lado, acreditamos que esta alteração na morfologia dos espermatozóides talvez possa ser explicada pela capacidade do DNA viral em transcrever nas células espermáticas, causando modificações fenotípicas que poderiam acarretar em alterações da forma normal. Desta maneira, serão necessários mais estudos nesta área.

A possibilidade de que HPV possa infectar células espermáticas é importante, porque isto implica que a infecção deve ser parte da fisiopatologia deste vírus e que os espermatozóides infectados possam se comportar como vetores, transmitindo o vírus para as parceiras no contato sexual. Além disso, também é possível que o espermatozóide com HPV seja a fonte de transmissão para os óvulos fertilizados e, possivelmente, para os fetos.

Espermatozóides são células capazes de receber HPV/DNA exógeno e, a sequência de DNA encontrada neles, parece representar os fragmentos adquiridos por meio do contato. O HPV/DNA foi observado no compartimento nuclear e citoplasmático do

espermatozóide, apesar de ainda não estar claro como o HPV atinge a célula espermática (Kadze *et al.*, 2002).

Estudos sugerem que o HPV pode ser capaz de transcrever em células espermáticas infectadas (Lai *et al.*, 1996; Lai *et al.*, 1997), enfatizando a potencial função destas células na transmissão do vírus. Os genes E6 e E7 do HPV têm sido relatados como sendo fortemente expressos nas células seminais infectadas (Lai *et al.*, 1996). Também tem sido sugerido que a presença do HPV causa diminuição na concentração espermática (Bezold *et al.*, 2007) e afeta a motilidade do espermatozóide, além da frequência de astenozoospermia ter sido relatada como aumentada em homens com infecção por HPV (Lai *et al.*, 1997). A presença de HPV no vaso deferente sugere que o reservatório de HPV/DNA deve estar localizado mais próximo do trato reprodutivo do que se pensava anteriormente (Rintala *et al.*, 2002). Entretanto, apenas um estudo analisou a morfologia espermática nos pacientes com HPV seminal, não encontrando tal relação (Lai *et al.*, 1997).

No presente trabalho, a análise morfológica pelo critério estrito de Tygerberg apresentou, no grupo HPV/DNA positivo, média de $2,59 \pm 1,94$, enquanto a média do grupo HPV/DNA negativo foi de $4,32 \pm 3,1$ ($p=0,007$), como apresentado na figura 10. No grupo HPV/DNA positivo para os tipos 16 ou 18, a média do critério estrito de Tygerberg foi de $3,25 \pm 1,49$. Esta significativa alteração na qualidade morfológica dos espermatozóides nos pacientes com HPV pode ser avaliada pela análise morfológica do critério da OMS (figura 11), onde os resultados mostraram que a média dos espermatozóides normais no grupo HPV/DNA positivo foi de $8,13 \pm 4,35$ e, no grupo HPV/DNA negativo, esta média foi de $11,86 \pm 7,91$ ($p=0,017$). Este dado mostra uma redução significativa dos espermatozóides considerados normais nos pacientes com HPV. Além disso, nestes pacientes foi observada uma tendência, estatisticamente não

significativa, ao aumento dos espermatozoides com forma afilada e gota citoplasmática. Comparando-se a morfologia pelo critério da OMS entre os grupos HPV/DNA positivo para os tipos 16 ou 18 versus HPV/DNA positivo para outros tipos, podemos observar um aumento significativo dos espermatozoides com forma macrocefalia ($p=0,048$)

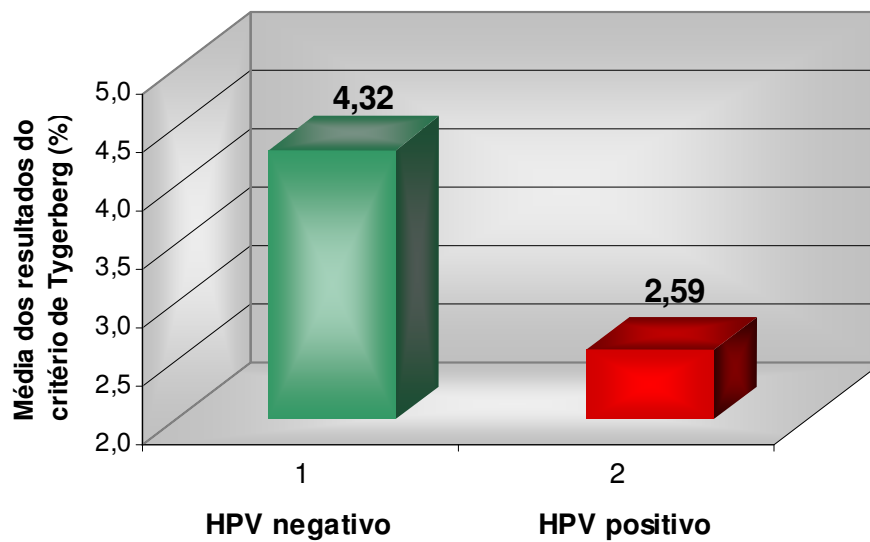


FIGURA 10: Análise morfológica pelo critério estrito de Tygerberg
Teste T; $p= 0,007$

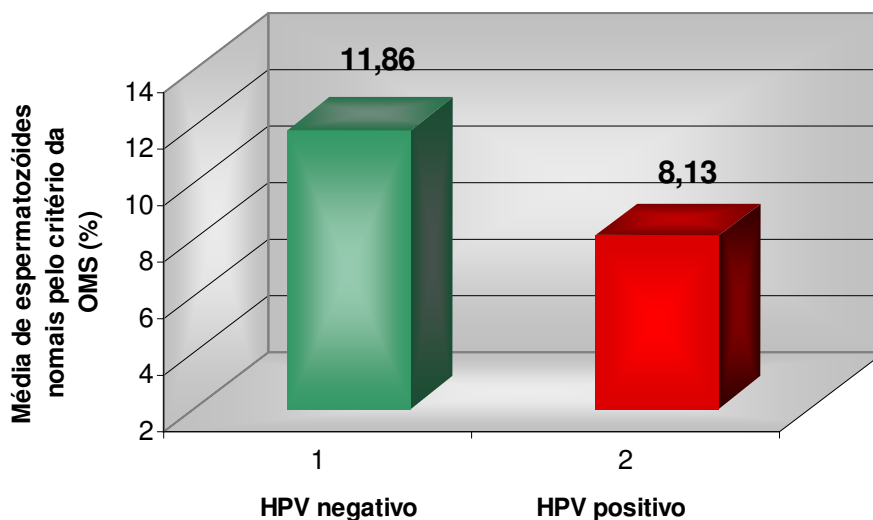


FIGURA 11: Análise morfológica pelo critério da OMS
 Teste T; $p= 0,017$

Por outro lado, Erles *et al.* (2001) encontraram HPV/DNA numa frequência similar em amostras com análise seminal normal e anormal (19% das normais e 16,4% das anormais). Tanaka *et al.* (2000), estudando HPV 16 em amostras seminais, encontraram positividade de 4% e não acharam diferenças significativas na qualidade seminal (concentração e motilidade) entre os grupos com e sem HPV. Rintala *et al.* (2004) indicaram que a presença de HPV no espermatozóide não afeta significativamente a medida dos parâmetros seminais, apesar da tendência em direção à danificação das características físicas, volume, motilidade e viabilidade na amostras HPV positivas quando comparadas com sêmen HPV negativo. Outro estudo realizado por Czegledy & Syarka (2006) mostrou que, apesar do HPV estar presente no sêmen de doadores, mesmo após o procedimento de processamento seminal, a presença do vírus não afetou o resultado da fertilização, sendo capaz de gerar prole saudável.

Estudos demonstram que um reservatório de HPV deve existir na genitália masculina (Pakendorf *et al.*, 1998; Rintala *et al.*, 2002) e que um possível veículo de transmissão do HPV do pai para a criança talvez seja o espermatozóide infectado (Lai *et al.*, 1996; Kadze *et al.*, 2002; Rintala *et al.*, 2005). Entretanto, não podemos descartar a hipótese de que o sêmen possa sofrer contaminação pelo vírus no momento da passagem pela uretra (Aynaud *et al.*, 2002), fato que não justificaria o surgimento de alterações na morfologia espermática, encontradas no presente trabalho, devido ao curto tempo de exposição. Estudo realizado na Finlândia com uma amostra pequena de pacientes (n=27) encontrou HPV/DNA na amostra de vaso deferente, o qual deve eliminar a questão da contaminação uretral (Rintala *et al.*, 2002). Portanto, o possível papel do homem como transmissor vertical do HPV ainda não foi completamente esclarecido.

A elevada prevalência de HPV encontrada no sêmen de pacientes sem lesão, neste estudo, sugere a necessidade de rastreamento deste vírus em homens que são cotados para a doação de sêmen, tendo em vista que os procedimentos de processamento seminal parecem não eliminar este vírus (Olatunbosun *et al.*, 2001).

Em virtude do fato de encontrarmos espermatozoides com morfologia alterada em pacientes com HPV, consideramos importante que o HPV seja detectado, genotipificado e se possível, prevenida sua infecção, podendo reduzir, assim, substancialmente, as infecções e enfermidade clínicas causadas por este vírus.

Estudos recentes indicam que a infertilidade masculina em homens com análise seminal normal, pode estar relacionada com o estresse oxidativo seminal (Pasqualotto *et al.*, 2001b). Tal estresse poderia estar associado à infecção por HPV, mesmo assintomática ou transitória, fato que nos leva a procurar uma relação entre estes dois eventos.

Muito embora, na infertilidade masculina, as ERO sejam conhecidas principalmente por seus efeitos deletérios na função espermática, existem evidências suficientes para apoiar a hipótese de que, em baixas e controladas concentrações, as espécies reativas do oxigênio participam nos mecanismos de sinalização da transdução como, por exemplo, capacitação espermática e reação acrossômica. Portanto, a geração controlada de ERO pelos espermatozóides está relacionada com uma função fisiológica normal (Aitken & Clarkson, 1987). Todavia, é importante destacar que existe grande variabilidade nos níveis do estresse oxidativo mesmo em homens inférteis (Pasqualotto *et al.*, 2001b). Além disso, o sítio de produção e o momento no qual o espermatozóide entra em contato com as ERO, determinam a presença ou não de infertilidade (Vicari, 1999). Portanto, os níveis do Estresse Oxidativo dependem do sítio de produção das ERO envolvidas, ou seja, se elas são produzidas pelos neutrófilos (extracelular), ou pelos espermatozóides (intracelular) (Pasqualotto *et al.*, 2000c; Potts *et al.*, 2000; Sharma *et al.*, 2001b).

É aceito o conceito de que as ERO estejam aumentadas em infecções crônicas urogenitais associadas com aumento no número de leucócitos (Potts *et al.*, 2000). Por outro lado, apesar de alguns estudos publicados na literatura, a relevância clínica da geração de ERO durante uma infecção do trato genital masculino não está resolvida e o seu significado biológico na prostatite permanece por ser estabelecido completamente (Shahed & Shoskes, 2000). O impacto dos leucócitos contaminantes na função espermática depende do número de células envolvidas, do estado de ativação leucocitária, da geração dos radicais livres e do sítio de produção dos leucócitos (próstata, epidídimo, uretra, etc.). O dano causado aos espermatozóides pode ser moderado se a infiltração leucocitária ficar confinada à próstata ou às vesículas seminais. Nestas circunstâncias, o espermatozóide

apenas entra em contato com as ERO, geradas pelos leucócitos, no momento da ejaculação. Entretanto, se os leucócitos foram originados no epidídimo ou testículo, as ERO poderão interagir com a membrana espermática por um longo período, aumentando as possibilidades de danificar os espermatozóides (Oschendorf, 1999; Vicari, 1999).

Essa relação sugere que, em casos de infecção das glândulas acessórias masculinas, a pobre qualidade espermática talvez decorra do excesso de produção de ERO e/ou uma citocina em particular, produzida no local, ou pelos leucócitos (Pasqualotto *et al.*, 2000c; Potts *et al.*, 2000; Sharma *et al.*, 2001b).

O teste de Endtz, que avalia a presença de leucócitos no plasma seminal, deve ser realizado sempre que o paciente apresentar uma quantidade de células redondas superior a 1 milhão/mL. Pelo fato de as células redondas poderem representar células germinativas imaturas ou leucócitos PMN, a realização desse teste torna-se mandatória na população de pacientes com mais de um milhão de células redondas por mililitro de sêmen (Shekarriz *et al.*, 1995).

Neste estudo, apenas 37% dos pacientes HPV positivos apresentaram positividade para o teste de Endtz e, 63% dos homens com infecção por HPV, não apresentaram positividade no teste de Endtz, ou seja, não apresentaram infecção leucocitária, conforme indicado na tabela 5 e na figura 12. Similar relação pode ser observada entre a variável presença de células redondas e infecção por HPV (tabela 5), confirmando a suspeita de que, a maioria das células visualizadas, corresponderam à presença de leucócitos, exceção observada para apenas 1 paciente, onde as células redondas representavam células germinativas imaturas.

TABELA 5: Avaliação do teste de Endtz e presença de células redondas

VARIÁVEIS	CATEGORIA	HPV/DNA NEGATIVO	HPV/DNAPOSITIVO	VALOR p*
		n=38	n= 30	
		%	%	
Teste de Endtz	positivo	19,4	37,0	NS
	negativo	80,6	63,0	
Presença de células redondas	positivo	22,2	37,0	NS
	negativo	77,8	63,0	

* Teste Qui-Quadrado. Foi considerado estatisticamente significativo $p < 0,05$.

NS: associação estatisticamente não significativa.

A ausência de relação entre o teste de Endtz e a presença de infecção por HPV mostra que não podemos nos basear no teste de Endtz como justificativa para a suspeita de infecção por HPV.

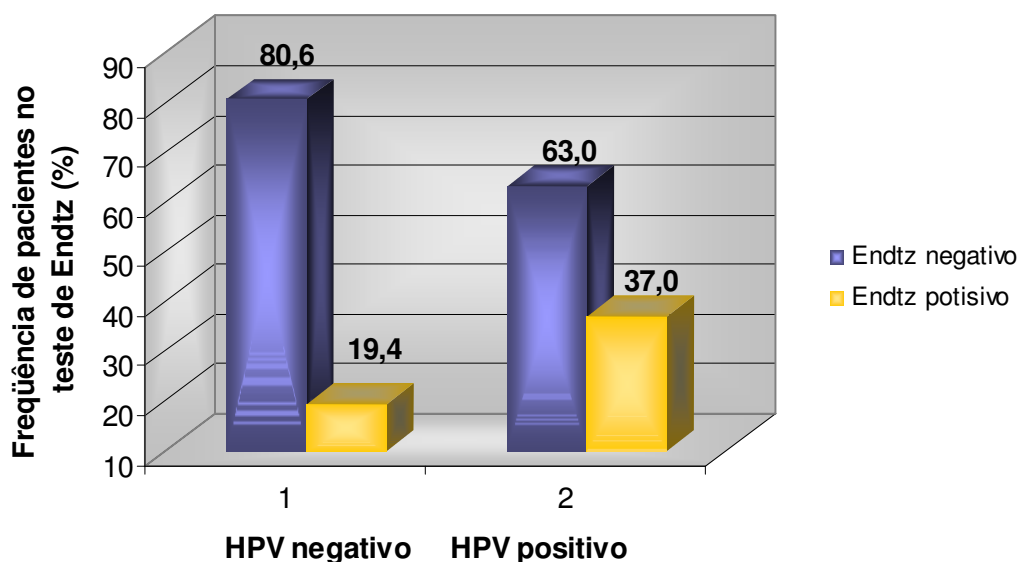


FIGURA 12: Teste de Endtz em relação ao HPV
Teste Qui-quadrado; $p = 0,120$

Para se entender a relação entre a qualidade seminal e o Estresse Oxidativo, torna-se necessária uma breve descrição sobre a espermatogênese. A espermatogênese é um processo ordenado, onde as células germinativas masculinas testiculares passam por fases seqüenciais de diferenciação para se desenvolver, subseqüentemente, no espermatozóide maduro capaz de fertilizar o ócito.

Durante uma espermatogênese normal (diferenciação de uma espermátide haplóide no espermatozóide maduro), o espermatozóide diminui a quantidade de citoplasma presente quando da sua maturação. Qualquer citoplasma residual geralmente é removido dos espermatozóides antes de sua liberação do epitélio germinativo do testículo (espermição) ou durante o trânsito epididimário. Falha na eliminação do excesso do citoplasma resulta na retenção de uma massa de citoplasma na peça intermediária dos espermatozóides. Acredita-se que a retenção de citoplasma residual pelo espermatozóide humano, relacione-se positivamente com a geração de ERO por meio de mecanismos mediados pela enzima citosólica G-6-PDH (Gomez *et al.*, 1996). Esta enzima regula a taxa do influxo de glicose pelo movimento da hexose monofosfato, a qual, por sua vez, controla a disponibilidade do NADPH intracelular.

Então, quando o espaço no citosol apresenta-se aumentado devido ao excesso de citoplasma residual, a maior atividade resultante de G-6-PDH leva à geração excessiva de NADPH e, este, à geração de ERO, as quais são geradas espontaneamente pelos espermatozóides humanos após sua liberação da cauda do epidídimo. Embora o espermatozóide de todas as regiões do epidídimo possam gerar O_2^- , apenas os espermatozóides localizados na cauda possuem a competência necessária para produzir H_2O_2 , sugerindo que este metabólito do oxigênio em particular, assim como o O_2^- , possam estar envolvidos na regulação da função espermática.

Recentes estudos têm mostrado que os espermatozoides com citoplasma residual em excesso possuem defeitos funcionais. Este excesso de citoplasma possui uma grande quantidade de enzimas, muitas delas causadoras de disfunção espermática. Além disso, a retenção de citoplasma residual é inversamente relacionada com a motilidade espermática.

Na tabela 6 pode-se observar a atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase e catalase nos pacientes HPV/DNA positivo e negativo. Os níveis de SOD foram semelhantes em todos os grupos, entretanto, níveis aumentados de catalase ($9,66 \pm 7,64$) foram detectados nos pacientes HPV positivos, especialmente no grupo formado pelos HPVs de alto risco oncogênico tipos 16 ou 18 ($14,76 \pm 9,80$), comparado aos pacientes HPV negativo ($p=0,005$ e $0,025$ respectivamente), como mostrado na figura 13.

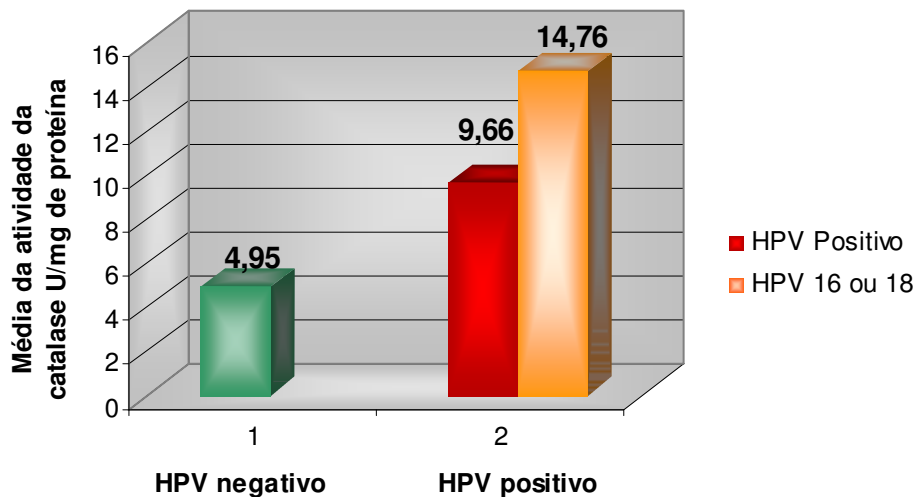


FIGURA 13: Atividade da catalase em relação ao HPV

Teste T

HPV negativo vs HPV positivo, $p= 0,005$

HPV negativo vs HPV 16 ou 18, $p= 0,025$

TABELA 6: Medida da atividade das enzimas superóxido dismutase e catalase

VARIÁVEIS	HPV/DNA NEGATIVO		HPV/DNA POSITIVO						VALOR DE p*			
	n=38 (1)		total n=30 (2)		tipo 16 ou 18 n=8 (3)		outros tipos n=22 (4)					
	média	dp	média	dp	média	dp	média	dp	1 vs 2	1 vs 3	1 vs 4	2 vs 3
Atividade SOD	26,6	24,8	25,5	17,2	24,9	10,7	25,8	19,3	NS	NS	NS	NS
Atividade CAT	4,9	4,8	9,6	7,6	14,7	9,8	7,8	5,9	0,005	0,025	0,048	0,092

* Teste T. Foi considerado estatisticamente significante p<0,05.

NS: associação estatisticamente não significativa.

Em condições normais existe um balanço entre a quantidade de ERO produzida e neutralizada. Os danos celulares surgem quando essa condição de equilíbrio é alterada, especialmente quando os sistemas celulares enzimáticos (SOD e CAT) não conseguem eliminar as concentrações aumentadas de ERO (Agarwal e Saleh, 2002).

Os resultados do presente trabalho sugerem que as defesas antioxidantes enzimáticas possam estar sendo ativamente expressas no plasma seminal, no sentido de neutralizar as ERO que estão sendo formadas pelos espermatozóides infectados, especialmente aqueles com morfologia alterada. Acredita-se que, a retenção de citoplasma residual pelo espermatozóide humano, esteja relacionada positivamente com a geração de ERO por meio de um mecanismo mediado pela enzima citosólica G-6-PDH (Pasquolotto *et al.*, 2000a).

Por meio da análise das correlações de Pearson, observamos que a atividade da catalase está correlacionada positivamente com o parâmetro cauda quebrada ($r=0,251$; $p=0,040$) e negativamente com o parâmetro morfológico de Tygerberg ($r= -0,260$; $p=0,035$), o que indica uma associação entre o aumento de CAT seminal em pacientes infectados por HPV e a diminuição da morfologia espermática normal. Porém, o presente estudo não endereça se aumento de catalase é causa ou efeito dos espermatozóides anormais em pacientes com HPV.

O espermatozóide e o plasma seminal contêm uma bateria de elementos neutralizadores e bloqueadores de ERO (Alkan *et al.*, 1997; Sikka *et al.*, 1995; Sharma *et al.*, 1999b; Lewis *et al.*, 1997), os quais incluem enzimas como a superóxido dismutase, catalase, o sistema glutatona peroxidase/redutase, α -tocoferol, ácido ascórbico, glutatona, piruvato, taurina, hipotaurina e albumina. Os neutralizadores das ERO geralmente encontrados, tais como a CAT e a SOD, embora muito efetivos quando as ERO são

produzidas no nível extracelular, são relativamente ineficazes quando a produção de ERO é intracelular.

O papel benéfico da terapia medicamentosa relacionada à interferência das ERO na infertilidade masculina tem recebido muita atenção nos últimos anos. Ainda que existam muitas evidências revelando o papel desempenhado pelas ERO em pacientes com infertilidade, o debate em relação ao valor dos antioxidantes na melhora dos parâmetros seminais permanece (Kessopoulou *et al.*,1995; Suleiman *et al.*,1996; Tarin *et al.*,1998; Geva *et al.*,1998). A concentração e o tipo do antioxidante a ser administrado permanecem por serem estabelecidos. Antioxidantes talvez sejam benéficos apenas nos casos de infertilidade, onde a etiologia da infertilidade seja o Estresse Oxidativo.

Com os resultados obtidos no presente trabalho, mostramos que as medidas da atividade da catalase existentes no plasma seminal de pacientes com infecção por HPV são superiores às encontradas nos homens sem a infecção, sugerindo um potencial mecanismo fisiopatológico para disfunção espermática nos pacientes com HPV. Esse achado endossa a hipótese de que a infecção por HPV, associada com a piora na qualidade seminal é, ao menos em parte, relacionada com o Estresse Oxidativo. O mecanismo bioquímico pelo qual ela induz à disfunção da espermatogênese não está elucidado. Serão necessárias mais pesquisas para chegarmos a uma conclusão definitiva.

Pesquisas futuras, envolvendo o uso de antioxidantes isoladamente ou em conjunto com o tratamento da infecção por HPV, deverão ser feitas para indicar o benefício de tal tratamento nestes pacientes.

6. CONCLUSÕES

1. A infecção por HPV apresenta associação significativa com a piora da qualidade seminal, no que diz respeito à morfologia do espermatozóide, tanto pelo critério da OMS, como pelo critério estrito de Tygerberg. Pacientes infectados com HPV apresentaram aumento na atividade de catalase seminal comparados aos pacientes sem infecção por HPV.

2. A prevalência de infecção seminal por HPV foi de 44,1%, sendo 11,8% referentes aos tipos 16 e 18.

3. O grupo formado pelos HPVs de alto risco oncogênico (16 e 18), não apresentou alterações, estatisticamente significativas, nas principais características seminais, apesar da tendência a diminuição dos parâmetros concentração e motilidade espermática.

4. A atividade da catalase apresentou maior aumento nos pacientes com HPV/DNA tipos 16 e 18.

5. A atividade da catalase seminal está relacionada negativamente com a morfologia segundo o critério estrito de Tygerberg e, positivamente, com o parâmetro morfológico cauda quebrada, de acordo com o critério da OMS.

6. Leucospermia não apresenta relação com infecção seminal por HPV.

7. PERSPECTIVAS

1. Aumentar o tamanho da amostra, objetivando uma resposta para a questão da influência do HPV na qualidade seminal, no estresse oxidativo e, talvez, na infertilidade masculina, bem como um melhor delineamento do perfil epidemiológico da população masculina infectada.

2. Classificar todos os pacientes HPV positivo quanto ao tipo específico.

3. Fornecer suplementação antioxidantes aos pacientes infectados, a fim de avaliar o papel benéfico da terapia medicamentosa relacionada à qualidade seminal.

4. Incluir na pesquisa pacientes com lesão peniana e comparar a incidência de infecção clínica e subclínica.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aebi H. (1984). Catalase in vitro. **Method enzymol.** 105: 121-126.
- Agarwal, A. (2004). Role of antioxidants in the treatment of men infertility: an overview of the literature. **Reprod Biomed.** 8: 616-27.
- Agarwal, A.; Ferreira, R. (2004). Estrés oxidativo y administración de antioxidantes en la esterilidad masculina. **Antioxidantes y Calidad de Vida.** 8:4 -11.
- Agarwal, A.; Prabakaran, S.A. (2005). Mechanism, measurement, and prevention of oxidative stress in male reproductive physiology. **Indian J Exp Biol.** 43(11): 963-74.
- Aitken, R.J. (2006). Sperm function tests and fertility. **Int J Androl.** 29(1): 69-75.
- Aitken, R.J.; Baker, M.A. (2006). Oxidative stress, sperm survival and fertility control. **Mol Cell Endocrinol.** 250(1-2): 66- 69.
- Aitken, R.J.; Best, F.S.; Richardson, D.W.; Djahanbakhch, O.; Lees, M.M. (1982). The correlates of fertilizing capacity in normal fertile men. **Fertil Steril.** 38(1): 68-76.
- Aitken, R.J.; Clarkson, J.S. (1987). Cellular basis of defective sperm function and its association with the genesis of reactive oxygen species by human spermatozoa. **J Reprod Fertil.** 81(2): 459-469.
- Aitken, R.J.; Clarkson, J.S.; Fishel, S. (1989). Generation of reactive oxygen species, lipid peroxidation and human sperm function. **Biology of Reproduction.** 40: 183- 197.
- Aitken, R.J.; Irvine, D.S.; Wu, F.C. (1991). Prospective analysis of sperm-oocyte fusion and reactive oxygen species generation as criteria for the diagnosis of infertility. **Am J Obstet Gynecol.** 164: 542- 551.
- Alkan, I.; Simsek, F.; Haklar, G.; Kervancioglu, E.; Ozveri, H.; Yalcin, S.; Akdas, A. (1997). Reactive oxygen species production by the spermatozoa of patients with idiopathic infertility: relationship to seminal plasma antioxidants. **J Urol.** 157: 140- 143.
- Alvarez, J.G.; Touchstone, J.C.; Blasco, L.; Storey, B.T. (1987). Spontaneous lipid peroxidation and production of hydrogen peroxide and superoxide in human spermatozoa. Superoxide dismutase as major enzyme protectant against oxygen toxicity. **J Androl.** 8: 338- 348.
- Andersen, A.G.; Jensen, T.K.; Carlsen, E.; Jorgensen, N.; Andersson, A.M.; Krarup, T.; Keiding, N.; Skakkebaek, N.E. (2000). High frequency of sub-optimal semen quality in an unselected population of young men. **Hum Reprod.** 15: 366- 372.
- Astori, G.; Pipan, C.; Muffato, G.; Botta, G.A. (1995). Detection of HPV-DNA in semen, urine and urethral samples by dot blot and PCR. **New Microbiol.** 18:143- 149.

- Auger, J.; Kunstmann, J.M.; Czyglik, F.; Jouannet, P. (1995). Decline in semen quality among fertile men in Paris during the past 20 years. **N Engl J Med.** 332(5): 281-285.
- Aynaud, O.; Poveda, J.D.; Huynh, B.; Guillemotonia, A.; Barasso, R. (2002). Frequency of herpes simplex virus, cytomegalovirus and human papillomavirus DNA in semen. **Int J Std AIDS.** 13: 547 - 550.
- Baker, M.A.; Aitken, R.J. (2005). Reactive oxygen species in spermatozoa: methods for monitoring and significance for the origins of genetic disease and infertility. **Reprod Biol Endocrinol.** (29); 3: 67.
- Bamister, J.V.; Calabrese (1987). Assis for Sod. **Methods Bichem Anal.** 32: 279-312.
- Bezold, G.; Politch, J.A.; Kiviat, N.B.; Kuypers, J.M.; Wolff, H.; Anderson, D.J. (2007). Prevalence of sexually transmissible pathogens in semen from asymptomatic male infertility patients with and whitout leukocytospermia. **Fertil Steril.** 87(5): 1087- 1097.
- Birkhead, T. (1999). The role of sperm competition in reproduction. In: Glover, T. D.; and Barratt, C.L.R. ed. Male fertility and infertility, Cambridge, UK, **Cambridge University Press.** 18-33.
- Bosch, F.X.; Castellsagué, X.; Munõz, N.; Sanjosé, S.; Ghaffari, A.M.; González, L.; Gili, M.; Izarzugaza, I.; Viladiu, P.; Navarro, C.; Vergara, A.; Ascunce, N.; Guerrero, E.; Shah, K.V. (1996). Male sexual behavior and human papillomavirus DNA: key risk factors for cervical cancer in spain. **J National Can Ins.** 88(15):1060- 1067.
- Bosch, F.X.; de Sanjose, S. (2003). Chapter 1: human papillomavirus and cervical cancer– burden and assessment of causality. **J Natl Cancer Inst Monogr.** 31: 3- 13.
- Brossfield, J.E.; Chan, P.J.; Patton, W.C.; King, A. (1999). Tenacy of exogenous human papillomavirus DNA in sperm washing. **J Assist Reprod Genet.** 16 (6): 325-8.
- Brown, T.; Yen-Moore, A.; Tyring, S. (1999). An overview of sexually transmitted diseases. Part II. **J American Academy Dermatology.** 41(part 1): 661-677; quiz 678- 680.
- Castellsagué, X.; Basch, F.X.; Munõz, N.; Meijer, C.J.; Shah, K.V.; de Sanjose, S.; Eluf-Neto, J.; Ngelangel, C.A.; Chichareon, S.; Smith, J.S.; Herrero, R.; Moreno, V.; Francheschi, S. (2002). Male circumcision, penile human papillomavirus infection, and cervical cancer in female partners. **N Engl J Med.** 346:1105- 1112.
- Castellsague, X.; Ghaffari, A.; Daniel, R.W.; Bosch, F.X.; Munoz, N.; Shah, K.U. (1997). Prevalence of penile human papillomavirus DNA in husbands of women with and without cervical neoplasia: a study in Spain and Colombia. **J Infect Dis.** 176(2): 353- 361.
- Castro, C.R.C.; de Gouvêa, T.V.D.; Passos, M.R.L. (1994). Infecção pelo Papilomavirus Humano (HPV) em homens de uma unidade militar. **J Bras DST.** 6:46- 53.

- Chakroun-Feki, N.; Ammar-Keskes, L.; Zouhir, S.; Hanen, G.; Khled, Z.; Tarek, R. (2001). Oxidative stress and male infertility: comparative study of combined vitamin E/selenium treatment versus vitamin B. **Hum Reprod.** Eshre Abstract P-024, Suíça, 2001.
- Chan, P.J.; Kalugdan, T.; Seraj, I.M.; Kalugdan, T.H.; King, A. (1994). Human papillomavirus gene sequences in washed human sperm deoxyribonucleic acid. **Fertil Steril.** 61 (5): 982-985.
- Chan, P.J.; Seraj, I.M.; Kalugdan, T.H.; King, A. (1996). Evidence of ease for transmission of human papillomavirus DNA from sperm to cells of the uterus and embryo. **J Assist Reprod Genetics.** 13: 516- 519.
- Chan, P.J.; Seraj, I.M.; Kalugdan, T.H.; King, A. (1995). Blastocysts exhibit preferential uptake of DNA fragment from the E6-E7 conserved region of the human papillomavirus. **Gynecol Oncol.** 58(2):194-197.
- de Villiers, E.M.; Fauquet, C.; Broker, T.R.; Bernard, H.U.; zur Hausen, H. (2004). Classification of papillomaviruses. **Virology.** 324 (1): 17- 27.
- Dokmeci, D. (2005). Oxidative stress, male infertility and the role of carnitines. **Folha Med.** (Plovdiv), 47(1):26- 30.
- Dunne, E.F.; Nielson, C.M.; Stone, K.M.; Markowitz, L.E.; Giuliano, A.R. (2006). Prevalence of HPV infection among men: a systematic review of the literature. **J Infect Dis.** 194: 1044- 1057.
- Erles, K.; Rohde, V.; Thaele, M.; Roth, S.; Edler, L.; Schlehofer, J.R. (2001). DNA of adeno-associated virus (AAV) in testicular tissue and in abnormal semen samples. **Hum Reprod.** 16: 2333- 2337.
- Eshre. (1996). Infertility revisited: the state of the art today and tomorrow. The ESHRE Capri Workshop. European Society for Human Reproduction and Embryology. **Hum Reprod.** 11(8):1779-1807.
- Favre, M.; Majewski, S.; Jesus, N.; Malejczyk, M.; Orth, G.; Jablonska, S. (1998). A possible vertical transmission of human papillomavirus genotypes associated with epidermodysplasia verruciformis. **J Investig Dermatol.** 111: 333- 336.
- Franceschi, S.; Castellsague, X.; Dal Maso, L.; Smith J.S.; Plummer, M.; Ngelangel, C.; Chichareon, S.; Eluf-Neto, J.; Shah, K.V.; Snijders, P.J.; Meijer, C.J.; Bosch, F.X.; Munoz, N. (2002). Prevalence and determinants of human papillomavirus genital infection in men. **Br J Cancer.** 86(5): 705-711.
- Franco, E.; Villa, L.; Sobrinho, J.; Prado, J.; Rousseau, M.; Desy, M.; Rohan, T. (1999). Epidemiology of acquisition and clearance of cervical human papillomavirus infection in women from a high-risk area for cervical cancer. **J Infect Dis.** 180:1415- 1423.

- Foote, R.H.; Hare, E. (2000). High catalase content of rabbit semen appears to be inherited. **J Androl.** 21: 664- 668.
- Galarneau, G. J.; Nagler, H. M. (1999). Cost-effective infertility therapies in the '90s: To treat or to cure? **Contemporary Urology.** 11: 32 – 45.
- García, I.G.; Mampaso, E.G.; Someso, S.C.; Pavón, E.M.; Nino, S.N.; Almagro, A.A. (2005). Infección por Papillomavirus en el hombre. Estado actual. **Actas Urol Esp.** 29 (4).
- Geva, E.; Lessing, J.B.; Lerner-Geva, L.; Amit, A. (1998). Free radicals, antioxidants and human spermatozoa: clinical implications. **Hum Reprod.** 13: 1422-1424.
- Gil-Guzman, E.; Ollero, M.; Sharma, R.K.; Lopez, M.C.; Alvarez, J.G.; Agarwal, A. (2001). Differential production of reactive oxygen species by subsets of human spermatozoa at different stages of maturation. **Hum Reprod.** 16: 1922- 1930.
- Gilbert, G. (2003). Human papillomavirus and human cancer. **Int J Cancer.** 133:121- 126.
- Giovannelli, L.; Migliore, M.C.; Capra, G.; Caleca, M.P.; Bellavia, C.; Perino, A.; Viviano, E.; Matranga, D.; Ammatuna, P. (2007). Penile, urethral and seminal sampling for diagnosis of human papillomavirus infection in men. **J Clin Microb.** 45: 248- 251.
- Gomez, E.; Buckingham, D.W.; Brindle, J.; Lanzafame, F.; Irvine, D.S.; Aitken, R.J. (1996). Development of an image analysis system to monitor the retention of residual cytoplasm by human spermatozoa: correlation with biochemical markers of the cytoplasmic space, oxidative stress, and sperm function. **J Androl.** 17: 276- 287.
- Gravitt, P.E.; Peyton, C.L.; Alessi, T.Q.; Wheeler, C.M.; Coutléer, F.; Hildesheim, A.; Schiffman, M.H.; Scott, D.R.; Apple, R.J. (2000). Improved amplification of genital human Papillomaviruses. **J Clin Microb.** 38: 357- 361.
- Green, J.; Monteiro, E.; Bolton, V.N.; Sanders, P.; Gibson, P.E. (1991). Detection of human papillomavirus DNA by PCR in semen from patients with and without penile wart. **Genitourin Med.** 67:207-210.
- Gross, G.E.; Barrasso, R. (1999). **Infecção por papilomavírus humano: atlas clínico de HPV.** Porto Alegre: Artes Médicas. pp 1- 18.
- Hallak, J.; Sharma, R.K.; Pasqualotto, F.F.; Ranganathan, P.; Thomas, A. J. JR.; Agarwal, A. (2001). Creatine kinase as an indicator of sperm quality and maturity in men with oligospermia. **Urology.** 58: 446- 451.
- Halliwell, B.; Gutteridge, J.M. (2000). Free radical in biology and medicine. **Oxford University Press:** New York ;936.

- Hippelainen, M.; Syrjanen, S.; Koskela, H.; Pulkkinen, J.; Saarikoski, S.; Syrjinen, K. (1993). Prevalence and risk factors of genital human papillomavirus (HPV) infections in healthy males: a study on Finnish conscripts. **Sex Transm Dis.** 20(6):321-328.
- Hermonat, P.L.; Han, L.; Wendel, P.J.; Quirk, J.G.; Stern, S.; Lowery, C.L.; Rechtin, T.M. (1997). Human papillomavirus is more prevalent in first trimester spontaneously aborted products of conception compared to elective specimens. **Virus Genes.** 14: 13- 17.
- Howley, P.M.; Lowy, D.R. (2001). Papillomaviridae and their replication. In: Knipe D M, Howley P M. **Fields virology.** New York, Lippincott Williams & Wilkins Publishers, 4ed, p. 2197- 2229.
- Husman, A. R.; Walboomers, J.M.M.; Brule, A.J.C.V.; Meijer, C.J.L.M.; Snijders, P.J.F. (1995). The use of general primers GP5 and GP6 elongated at their 3' ends with adjacent highly conserved sequences improves human papillomavirus detection by PCR. **J Gen Virology.** 76: 1057-1062.
- Ishikawa, M.; Takuma, F.; Masumoto, N.; Saito, M.; Mukai, M.; Nindl, I.; Ridder, R.; Fukuchi, T.; Kubushiro, K.; Tsukazaki, K., Nozawa, S. (2003). Correlation of p16^{INK4A} overexpression with human papillomavirus infection in cervical adenocarcinomas. **Int J Gyn Pathol.** 22: 378- 385.
- Jones H W Jr, Toner J P. The infertile couple. **N Engl J Med.** Boston 1993;329:1710.
- Jozwik, M.; Jozwik, M.; Kuczynski, W.; Szamatowicz, M. (1997). No enzymatic antioxidant activity of human seminal plasma. **Fertil Steril.** 68: 154- 157.
- Kadze, R.; Chan, P.J.; Jacobson, J.D.; Corselli, J.U.; King, A. (2002). Temperature variable and the efficiency of sperm mediated transfection of HPV16 DNA into cells. **Asian J Androl.** 4: 169-173.
- Kapranos, N.; Petrakou, E.; Anastasiadou, C.; Kotronias, D. (2003). Detection of herpes simplex virus, cytomegalovirus, and Epstein-Barr virus in the semen of men attending an infertility clinic. **Fertil Steril.** 79: 1566- 1570.
- Kessopoulou, E.; Powers, H.J.; Sharma, K.K.; Pearson, M.J.; Russell, J.M.; Cooke, I.D.; Barratt, C.L. (1995). A double blind randomized placebo cross-over controlled trial using the antioxidant vitamin E to treat reactive oxygen species associated male infertility. **Fertil Steril.** 64: 825- 831.
- Kobayashi, T.; Miyazaki, T.; Natori, M.; Nozawa, S. (1991). Protective role of superoxide dismutase in human sperm motility: superoxide dismutase activity and lipid peroxide in human seminal plasma and spermatozoa. **Hum Reprod.** 6: 987- 991.
- Koh, Y.H.; Yoon, S.J.; Park, J.W. (1997). Lipid peroxidation product-mediated DNA damage and mutagenicity. **J Biochem Mol Biol.** 30: 188- 193.

- Kotronias, D.; Kapranos, N. (1998). Detection of herpes simplex virus DNA in human spermatozoa by in situ hybridization technique. **In Vivo**. 12: 391- 394.
- Koutsky, L. (1997). Epidemiology of genital human papillomavirus infection. **Am J Med**. 102 (5A):3- 8.
- Kyo, S.; Inoue, M.; Koyama, M.; Fujita, M.; Tanizawa, O.; Akura, A. (1994). Detection of high-risk human papillomavirus in the cervix and sêmen of sex partners. **J Infect Dis**. 170: 862- 865.
- Kruger, T.F.; Acosta, A.A.; Simmons, K.F.; Swanson, R.J.; Matta, J.F.; Oehninger, S. (1988). Predictive value of abnormal sperm morphology in in vitro fertilization. **Fertil Steril**. 49: 112- 117.
- Lai, Y.M.; Lee, J.F.; Huang, H.Y.; Soong, Y.K.; Yang, F.P.; Pao, C.C. (1997). The effect of human papillomavirus infection on sperm motility. **Fertil Steril**. 67: 1152-1155.
- Lai, Y.M.; Uang, F.P.; Pao, C.C. (1996). Human papillomavirus deoxyribonucleic acid and ribonucleic acid in seminal plasma and sperm cells. **Fertil Steril**. 65: 1026- 1030.
- Lavitrano, M; Camaioni, A; Fazio, V.M; Dolci, S.; Farace, M.G.; Spadafora, C. (1989). Sperm cells as vectors for introducing foreign DNA into eggs: genetic transformations of mice. **Cell** . 57(5):717- 723.
- Lemkecher, T.; Dartigues, S.; Vaysse, J.; Kulski, O.; Barraud-Lange, V.; Gattegno, L.; Wolf, J.P. (2005). Leucocytospermia, oxidative stress and male infertility: facts and hypotheses. **Gynecol Obstet Fertil**. 33(1-2): 2- 10.
- Lewis, S.E.M.; Boyle, P.M.B.; McKinney, K.A. (1995). Total antioxidant capacity of seminal plasma is different in fertile and infertile men. **Fertil Steril** 64: 868-870.
- Lewis, S.E.M.; Sterling, E.S.; Young, I.S.; Thompson, W. (1997). Comparison of individual antioxidants of sperm and seminal plasma in fertile and infertile men. **Fertil Steril**. 67(1): 142- 147.
- McCall, M.R.; Frei, B. (1999). Can antioxidant vitamins materially reduce oxidative damage in humans? **Free Radical Biomed**. 26(7-8): 1034- 1053.
- Margall Coscojuela, N. **Infecciones por Papilomavirus**. Editorial Médica Panamericana, Madrid 2006.
- Martin, R.W.; Rady, P.; Arany, I.; Tying, S.K. (1993). Benign Leydig cell tumor of the testis associated with human papillomavirus type 33 presenting with the sign of LeserTrelat. **J Urol**. 150:1246- 1250.
- Meier, B.; Habermehl, G.G. (1990). Evidence for superoxide dismutase and catalase in mollicutes and release of reactive oxygen species. **Arch Biochem Biophys**. 15: 74- 79.

- Molijn, A.; Kleter, B.; Quint, W.; Doorn, L.J. (2005). Molecular diagnosis of human papillomavirus (HPV) infections. **J Clin Virol.** 32 (suppl.): 43- 51.
- Munõz, N. (2000). Human papillomavirus and cancer: The epidemiological evidence. **J Clin Virol.** 19:1- 5.
- Munõz, N.; Bosch, F.X.; Sanjose, S.; Herrero, R.; Castellsagué, X.; Shah, K.V.; et al. (2003). Epidemiologic classification of Human Papillomavirus types associated with cervical cancer. **N Engl J Med.** 348: 518- 527.
- Nallella, K.P.; Sharma, R.K.; Allamaneni, S.S.R.; Agarwal, A. (2005). Identification of male factor infertility using a novel semen quality score and reactive oxygen species levels. **Clinics.** 60(4): 317- 324.
- Nicolau, S.M.; Camargo, C.G.C.; Stávale, J.N.; Castelo, A.; Dores, G.B.; Lórinez, A.; Lima, G.R. (2005). Human papillomavirus DNA detection in male sexual partners of women with genital human papillomavirus infection. **Urology.** 65:251-255.
- Oehninger, S.; Acosta, A.A.; Morshedi, M.; Veeck, L.; Swanson, R.J.; Simmons, K.; Rosenwaks, Z. (1988). Corrective measures and pregnancy outcome in in vitro fertilization in patients with severe sperm morphology abnormalities. **Fertil Steril.** 50(2):283- 287.
- Olatunbosun, O.; Deneer, H.; Pierson, R. (2001). Human papillomavirus DNA detection in sperm using polymerase chain reaction. **Obstet Gynecol.** 97: 357-360.
- Ombelet, W.; Wouters, E.; Boels, L.; Cox, A.; Janssen, M.; Spiessens, C.; Vereecken, A.; Bosmans, E.; Steeno, O. (1997). Sperm morphology assessment: diagnostic potential and comparative analysis of strict or WHO criteria in a fertile and a subfertile population. **Int J Androl.** 20(6):367- 372.
- Oschendorf, F.R. (1999). Infections in the male genital tract and reactive oxygen species. **Hum Reprod Update.** 5(5): 399- 420.
- Pakendorf, U.W.; Bornman, M.S.; Du Plessis, D.J. (1998). Prevalence of human papillomavirus in men attending the infertility clinic. **Androl.** 30:11-14.
- Pao, C.C.; Yang F.P.; Lai, Y.M. (1996). Preferential retention of the E6 and E7 regions of the human papillomavirus type 18 genome by human sperm cells. **Fertil Steril.** 66(4): 630- 633.
- Pasqualotto, F.F.; Agarwal, A.; Srivastava, M.; Nelson, D.R.; Thomas, A.J.Jr. (1999). Fertility outcome after repeat vasospermoclysis. **J Urology.** 162(5):1626 -1628.
- Pasqualotto, F.F.; Kobayashi, H.; Daitch, J.A.; Agarwal, A.; Thomas, Jr.A.J. (2000b). Detection of testicular cancer in men presenting with infertility. **Urology Times.** 28: 24.

- Pasqualotto, F.F.; Pasqualotto, E.B.; Umezu, F.M.; Salvador, M. (2006). Níveis de antioxidantes enzimáticos no plasma seminal de homens férteis e inférteis. **Reproducción Humana**. 11-18.
- Pasqualotto, F.F.; Sharma, R. K.; Kobayashy, H.; Nelson, D. R.; Thomas, A.J.Jr.; Agarwal, A. (2001a). Poor semen quality and ROS-TAC scores in patients with idiopathic infertility. Pôster - **97º Encontro anual da Associação Americana de Urologia**. Anaheim, CA, EUA, junho 2-7.
- Pasqualotto, F.F.; Sharma, R. K.; Nelson, D.R.; Thomas, A.J.Jr.; Agarwal, A. (2001b). Oxidative stress in normospermic men undergoing infertility evaluation. **J Androl**. 22: 316- 322.
- Pasqualotto, F.F.; Sharma, R.K.; Nelson, D.R.; Thomas, A.J.Jr.; Agarwal, A. (2000a). Relationship between oxidative stress, semen characteristics, and clinical diagnosis in men undergoing infertility investigation. **Fertil Steril**. 73(3): 459- 464.
- Pasqualotto, F.F.; Sharma, R.K.; Potts, J.M.; Nelson, D.R.; Thomas, A.J.; Agarwal, A. (2000c). Seminal oxidative stress in patients with chronic prostatitis. **Urology**. 55(6):881-885.
- Pasqualotto, F.F.; Umezu, F.M.; Salvador, M.; Borges, E. Jr.; Sobreiro, B.P.; Pasqualotto, E.B. (2008). Effect of cigarette smoking in antioxidant levels and presence of leukocytospermia in infertile men: a prospective study. **Fertil Steril, in press**.
- Patridge, J.M.; Koutsky, L.A. (2006). Genital human papillomavirus infection in men. **Lancet infect Dis**. 6: 21-31.
- Potts, J.M.; Sharma, R.K.; Pasqualotto, F.F.; Nelson, D.R.; Agarwal, A. (2000). Ureaplasma urealyticum infection in men associated with abnormal seminal reactive oxygen species (ROS) and absence of leukocytospermia. **J Urol**. 163:1775-1778.
- Potts, R.J.; Jefferies, T.M.; Notarianni, L.J. (2001). Antioxidant capacity of epididymis. **Hum Reprod**. 14(10): 2513- 2516.
- Riley, J.C.; Behrman, H.R. (1991). Oxygen radicals and reactive oxygen species in reproduction. **Proc Soc Exp Biol Med**. 198: 781- 791.
- Rintala, M.A.M.; Grénman, S.E.; Pöllänen, P.P.; Suominen, J.J.O.; Syrjänen, S.M. (2004). Detection of high-risk HPV DNA in semen and its association with the quality of semen. **Int J STD & AIDS**. 15: 740- 743.
- Rintala, M.A.M.; Grénman, S.E.; Puranen, M.H.; Isolauri, E.; Ekblad, U.; Kero, P.O.; Syrjänen, S.M. (2005). Transmission of high-risk human papillomavirus between parents and infant: a prospective study of HPV in families in finland. **J Clin Microb**. 43: 376- 381.
- Rintala, M.A.M.; Pöllänen, P.P.; Nikkanen, V.P.; Grénman, S.E.; Syrjänen, S.M. (2002). Human Papillomavirus DNA is found in the vas deferens. **J Infect Dis**. 185: 1664- 1667.

- Rodhe, V.; Erles, K.; Satter, H.P.; Derouet, H.; Wullich, B.; Schlehofer, J.R. (1999). Detection of adeno-associated virus in human semen: does viral infection play a role in the pathogenesis of male infertility? **Fertil Steril.** 72: 814- 816.
- Rodhen, E.L.; Lucas, M.L.; Pereira-Lima, L.; Rodhen, C.R.; Souto, C.A.S. (2001). Effects of L-arginine on the kidney levels of malondialdehyde in rats submitted to renal ischaemia-reperfusion. **B J U Int.** 88: 273 - 277.
- Rohan, T.; Mann, V.; Mc Laughlin, J.; Harnish, D.G.; Yu, H.; Smith, D.; Davis, R.; Shier, R.M.; Rawls, W. (1991). PCR-detected genital papillomavirus infection: prevalence and association with risk factors for cervical cancer. **Int J Cancer.** 49 (6):856-860.
- Rolf, C.; Cooper, T.G.; Yeung, C.H.; Nieschlag, E. (1999). Antioxidant treatment of patients with asthenozoospermia or moderate oligoasthenozoospermia with high-dose vitamin C and vitamin E: a randomized, placebo-controlled, double-blind study. **Hum Reprod.** 14: 1028- 1033.
- Rombaldi, R.L.; Serafini, E.P.; Villa, L.L.; Vanni, A.C.; Baréa, F.; Franssini, R.; Xavier, M.; Paesi, S. (2006). Infection with human papillomaviruses of sexual partners of women having cervical intraepithelial neoplasia. **Br J Med. Research.** 39:177-187.
- Rotola, A.; Costa, S.; Monini, P.; Vendra, C.; Guida, G.; Terzano, P.; Di Luca, D.; Martinelli, G.; Cassai, E. (1994). Impact of sexual habits on the clinical evaluation of male HPV infection. **Eur J Epidemiol.** 10(4): 373- 380.
- Saleh, R.A.; Agarwal, A.; Nelson, D.R.; Nada, E.A.; El-Tonsy, M.H.; Alvarez, J.G.; Thomas, A.J.Jr.; Sharma, R.K. (2002). Increased sperm nuclear damage in normozoospermic infertile men: a prospective study. **Fertil Steril.** 78: 313-318.
- Saleh, R.; Agarwal, A. (2002). Oxidative stress and male infertility: from research bench to clinical practice. **J Androl.** 23: 737- 752.
- Svare, E.I.; Kjaer, S.K.; Worm, A.M.; Osterlind, A.; Meijer, C.J.L.M.; van den Brule, A.J.C. (2002). Risk factors for genital HPV DNA in men resemble those found in women: a study of male attendees at a Danish STD clinic. **Sex. Transm Infect.** 78:215- 218.
- Seibel, M. M. (1996). Infertility. 2 ed. New York: **Appleton and Lange.** 1996
- Shahed, A.R.; Shoskes, D.A. (2000). Oxidative stress in prostatic fluid of patients with chronic pelvic pain syndrome: correlation with gram positive bacterial growth and treatment response. **J Androl.** 21(5): 669-675.
- Sharma, R.K.; Agarwal, A. (1996). Role of reactive oxygen species in male infertility. **Urology.** 48: 835- 850.

- Sharma, R.K.; Pasqualotto, F.F.; Goyal, K.; Thomas, J.A.Jr.; Nelson, D.R.; Agarwal, A. (1999a). Relationship between oxidative stress and semen quality in infertile men. **95° Encontro anual da Associação Americana de Urologia**. Abstract. pp.1349. Dallas, 1999.
- Shama, R.K.; Pasqualotto, F.F.; Nelson, D.R.; Thomas, A.J.Jr.; Agarwal, A. (1999b). The reactive oxygen species-total antioxidant capacity score is a new measure of oxidative stress to predict male infertility. **Hum Reprod**. 14: 2801-2807.
- Sharma, R.K.; Pasqualotto, F.F.; Nelson, D.R.; Thomas, A.J.Jr.; Agarwal, A. (2000). Oxidative stress and semen score-new measures of semen quality in patients undergoing infertility treatment. **96° Encontro anual da Associação Americana de Urologia**. Atlanta, GO, EUA, abril 29-maio 4, 2000.
- Sharma, R.K.; Pasqualotto, F.F.; Nelson, D.R.; Thomas, A.J.Jr.; Agarwal, A. (2001). Relationship between seminal white blood cell counts and oxidative stress in men treated at an infertility clinic. **J Androl**. 22(4): 575- 583.
- Sharma, R.K.; Pasqualotto, F.F.; Nelson, D.R.; Thomas, A.J.Jr.; Agarwal, A. (2001b). Role of leukocytospermia in oxidative stress. In press. **J Androl**.
- Shekarriz, M.; Sharma, R.K.; Thomas, A.J.; Agarwal, A. (1995). Positive myeloperoxidase staining (Endtz test) as an indicator of excessive reactive oxygen species formation in semen. **J Assist Reprod Genet**. 12 (2):70- 74.
- Skerlev, M.; Giri, M.; SKerlev, H.S. (2002). Human Papillomavirus male genital infections: Clinical variations and the Significance of DNA Typing. **Clinics Dermatol**. 20:173- 178.
- Sikka, S.C. (1996). Oxidative stress and role of antioxidants in normal and abnormal sperm function. **Front Biosci**. 1: 78-86.
- Sikka, S.C.; Rajasekaran, M.; Hellstrom, W.J. (1995). Role of oxidative stress and antioxidants in male infertility. **J Androl**. 16(6):464-481.
- Smith, R.; Vantman, D.; Ponce, J.; Escobar, J.; Lissi, E. (1996). Total antioxidant capacity of human seminal plasma. **Hum Reprod**. 11(8): 1655- 1660.
- Stone K M, Karem K L, Sternberg M R et al. Seroprevalence of human papillomavirus type 16 infection in the United States. **J Infect Dis** 2002; 186: 1396-402.
- Storey, B.T.; Alvarez, J.G.; Thompson, K.A. (1998). Human sperm glutathione reductase activity in situ reveals limitation in the glutathione antioxidant defense system due to supply of NADPH. **Mol Reprod Dev**. 49: 400- 407.
- Suleiman, S.A.; Ali, M.E.; Zaki, Z.M.; El-Malik, E.M.; Nasr, M.A. (1996). Lipid peroxidation and human sperm motility: protective role of vitamin E. **J Androl**. 17: 530-537.

- Svec, A.; Mikyskova, I.; Hes, O.; Tachezy, R. (2003). Human papillomavirus infection of the epididymis and ductus deferens. **Arch Pathol Lab Med.** 127: 1471-1474.
- Syrjänen, S.; Puranen, M. (2000). Human papillomavirus infection in children: the potential role of maternal transmission. **Crit Rev Oral Biol Med.** 11: 259-274.
- Tanaka, H.; Karube, A.; Kodama, H.; Fukuda, J.; Tanaka, T. (2000). Mass screening for human papillomavirus type 16 infection in infertile couples. **J Reprod Med.** 45: 907- 911.
- Tarin, J.J.; Brines, J.; Cano, A. (1998). Is antioxidant therapy a promising strategy to improve human reproduction? Antioxidants may protect against infertility. **Hum Reprod.** 13: 1415- 1416.
- Tortolero, I.; Duarte, O.J.M.; Pamplona, C.M.; Alvarez, G.E.; Arata-Bellabarba, G.; Regadera, J.; Leiva, G.O. (2004). The effect of seminal leukocytes on semen quality in subfertile males with and without varicocele. **Arch Esp Urol.** 57(9): 921- 928.
- Twigg, J.; Fulton, N.; Gómez, E.; Irvine, D.S.; Aitken, R.J. (1998). Analysis of the impact of intracellular reactive oxygen species generation on the structural and functional integrity of human spermatozoa: lipid peroxidation, DNA fragmentation and effectiveness of antioxidants. **Hum Reprod.** 13: 1429-1436.
- Vicari, E. (1999). Seminal leukocyte concentration and related specific reactive oxygen species production in patients with male accessory gland infections. **Hum Reprod.** 14(8):2025-2030.
- Wang, S.S.; Schiffman, M.; Shields, T.S.; Herrero, R.; Hildesheim, A.; Bratti, M.C.; Scherman, M.E.; Rodriguez, A.C.; Castle, P.E.; Morales, J.; Alfaro, M.; Wright, T.; Chen, S.; Clayman, B.; Burk, R.D.; Viscidi, R.P. (2003). Seroprevalence of human papillomavirus-16,-18,-31, and -45 in a population-based cohort of 10000 women in Costa Rica. **Br J Cancer.** 89(7):1248-1254.
- Wang, X.; Zhu, Q.; Rao, H. (1998). Maternal-fetal transmission of human papillomavirus. **Chin Med J.** 111:726- 727.
- Wolff, H.; Politch, J.A.; Martinez, A.; Haimovici, F.; Hill, J.A.; Anderson, D.J. (1990). Leukocytospermias associated with poor semen quality. **Fertil Steril.** 53: 528- 536.
- World Health Organization:** WHO Laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction, Cambridge, Cambridge University Press, 1999.
- Xu, S.; Liu, L.; Lu, S.; Ren, S. (1998). Clinical observation on vertical transmission of human papillomavirus. **Chin Med Sci J.** 13:29- 31.
- Zalata, A.A.; Christophe, A.B.; Depuydt, C.E.; Schoonjans, F.; Comhaire, F.H. (1998). The fatty acid composition of phospholipids of spermatozoa from infertile patients. **Mol Hum Reprod.** 4: 111- 118.

Zini, A.; Buckspan, M.; Jamal, M.; Jarvi, K. (1999). Effect of varicocelelectomy on the abnormal retention of residual cytoplasm by human spermatozoa. **Hum Reprod.** 14: 1791- 1793.

Zini, A.; De Lamirande, E.; Gagnon, C. (1993). Reactive oxygen species in semen of infertile patients: levels of superoxide dismutase and catalase-like activities in seminal plasma and spermatozoa. **Int J Androl.** 16:183- 188.

Zini, A.; Garrels, K.; Phang, D. (2000). Antioxidant activity in the semen of fertile and infertile men. **Urology.** 55(6): 922- 926.

ANEXO A: Descrição dos oligonucleotídeos utilizados nas reações de PCR.

Oligonucleotídeos	Segmento identificado	Seqüência de bases
PCO4	β-globina humana	CAACTTCATCCACGTTCCACC
GH20	β-globina humana	GAAGAGCCAAGGACAGGTAC
PGMY09: F G H I J K L M N P Q R HMB01	L1 viral	CGTCCCAAAGGAAACTGATC CGACCTAAAGGAAACTGATC CGTCCAAAAGGAAACTGATC GCCAAGGGGAAACTGATC CGTCCCAAAGGATACTGATC CGTCCAAGGGGATACTGATC CGACCTAAAGGGAATTGATC CGACCTAGTGGAAATTGATC CGACCAAGGGGATATTGATC GCCCAACGGAAACTGATC CGACCCAAGGGAAACTGGTC CGTCCTAAAGGAAACTGGTC GCGACCCAATGCAAATTGGT
PGMY11: A B C D E	L1 viral	GCACAGGGACATAACAATGG GCGCAGGGCCACAATAATGG GCACAGGGACATAATAATGG GCCCAGGGCCACAACAATGG GCTCAGGGTTTAAACAATGG
GP05+ (interno)	L1 viral	TTTGTTACTGTGGTAGATACTAC
GP06+ (interno)	L1 viral	CTTATACTAAATGTCAAATAAAAAG
419-438 (externo)	E6/E7 viral HPV16	TGTCAAAAGCCACTGTGTCC
637-656 (externo)	E6/E7 viral HPV16	GAGCTGTCAATTTAATTGCTC
493-512 (interno)	E6/E7 viral HPV16	TCGGTGGACCGGTCGATGTA
606-625 (interno)	E6/E7 viral HPV16	GATCAGTTGTCTCTGGTTGC
426-445 (externo)	E6/E7 viral HPV18	TGCCAGAAACCGTTGAATCC
674-693 (externo)	E6/E7 viral HPV18	TCTGAGTCGCTTAATTGCTC
492-511 (interno)	E6/E7 viral HPV18	ATAGCTGGGCACTATAGAGG
596-615 (interno)	E6/E7 viral HPV18	TGCAATGTTGCCTTAGGTCC

ANEXO B

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

I- DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA

1. NOME DO PACIENTE:.....
DOCUMENTO DE IDENTIDADE No.:..... SEXO: M () F ()
DATA NASCIMENTO:/...../.....
ENDEREÇO:.....
No. APTO..... CEP:.....
TELEFONE: DDD (.....)

II – DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA

2.1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA:

“INFECÇÃO VIRAL CAUSADA PELO PAPILOMAVÍRUS HUMANO TIPOS 16 E/OU 18 E SUA INFLUÊNCIA NA QUALIDADE SEMINAL E NO ESTRESSE OXIDATIVO.”

2.2 UNIDADE EXECUTORA:

Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, RS

2.3 PESQUISADORES

Bioq. Letícia Lucchese (mestranda Biotecnologia)
Prof. Dra. Jovana Mandelli (DCBM – CCBS - UCS)
Prof. Dra. Mírian Salvador (DCBM – CCBS - UCS)
Prof. Dr. Eduardo Pretto Serafini (DCBM – CCBS - UCS)
Prof. Dr. Fábio Firmbach Pasqualotto (DCBM e CCBS / UCS)
Prof. Msc. Renato Rombaldi (DCBM – CCBS - UCS)

2.4 ENDEREÇOS PARA CONTATO:

Dr. Fábio Firmbach Pasqualotto
Conception – Centro de Reprodução Humana
Rua Pinheiro Machado, 2569 sala 23/24
CEP: 95020170, Caxias do Sul, RS, Brasil
Fone/Fax: (054) 3214 4095
e-mail: Fabio@conception-rs.com.br

2.5 AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

SEM RISCO RISCO MÍNIMO RISCO MÉDIO
 RISCO BAIXO RISCO MAIOR

(probabilidade de que o indivíduo sofra algum dano como consequência imediata ou tardia do estudo)

2.6 DURAÇÃO DA PESQUISA:

24 meses

III- EXPLICAÇÕES AO PACIENTE SOBRE A PESQUISA:

A infertilidade conjugal incide sobre 15% dos casais em idade reprodutiva. O homem corresponde a 50% das causas. Além disso, pacientes com câncer de testículo, leucemia e linfoma podem apresentar esterilidade permanente com os atuais tipos de tratamento usados.

1. Objetivos da pesquisa:

Estudar a presença do vírus HPV no plasma seminal/espermatozóides de homens cujas mulheres apresentem o vírus do HPV humano. Além disso, correlacionar a presença do HPV com as principais características seminais (concentração, motilidade e morfologia espermática) e com a presença ou não de infertilidade. Por fim, avaliar os marcadores do estresse oxidativo e comparar pacientes que apresentam positividade para o HPV com pacientes negativos para o HPV. Caso exista uma correlação da presença do HPV e as principais características seminais, ou presença ou não de infertilidade, estabelecer o screening do vírus do HPV nos pacientes masculinos com dificuldade para estabelecer gravidez ou com alterações seminais. Com o tratamento do vírus do HPV nos pacientes com infertilidade, diminuiríamos a necessidade de tratar pacientes com tecnologia mais cara como inseminação intrauterina ou mesmo fertilização *in vitro* e aumentaríamos as taxas de gravidez com a utilização de terapias contra o vírus do HPV, visto que existe uma correlação já bem estabelecida na literatura entre estresse oxidativo e baixas taxas de gravidez mesmo com técnicas de fertilização *in vitro*.

2. Procedimentos que serão utilizados e propósitos, incluindo a identificação dos procedimentos que são experimentais:

Medida da peroxidação lipídica da membrana dos espermatozóides, níveis de catalase e superóxido dismutase, avaliar concentração, motilidade e morfologia espermática, a presença ou não do papiloma vírus nas amostras seminais.

3. Desconfortos e riscos esperados:

Desconforto mínimo, resumindo-se à coleta de sêmen (espermograma) pelo paciente, a qual possui uma duração aproximada de 10 a 30 minutos.

4. Benefícios que poderão ser obtidos:

O resultado do exame laboratorial (espermograma e presença ou não do HPV na amostra seminal) será comunicado ao paciente.

5. Procedimentos alternativos que possam ser vantajosos para o indivíduo:

Os procedimentos alternativos (eletroejaculação) vão requerer metodologia e sofisticação maior que a proposta aqui apresentada, além de ser de maior custo.

IV – ESCLARECIMENTOS DADOS PELO PESQUISADOR SOBRE GARANTIAS DO SUJEITO DA PESQUISA:

1. O voluntário participará de maneira gratuita deste projeto com a doação de sêmen para a realização de análises bioquímicas e testes específicos no sêmen.
2. Acesso, a qualquer tempo, às informações sobre procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa, inclusive para dirimir eventuais dúvidas.
3. Liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e de deixar de participar do estudo, sem que isto traga prejuízo à continuidade da assistência.
4. Salvaguarda da confidencialidade, sigilo e privacidade.
5. Todas as análises bioquímicas serão realizadas de forma confidencial, não sendo identificado o voluntário. As publicações não incluirão qualquer referência ao nome do doador que possam identificá-lo.

V – OBSERVAÇÕES COMPLEMENTARES

Após realizar todos os testes e avaliar a presença do HPV no sêmen, as amostras serão descartadas, não podendo ser utilizadas para outro fim.

VI – CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO

Declaro que, após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar do presente Protocolo de Pesquisa.

Caxias do Sul, de de .

Assinatura do sujeito da pesquisa ou responsável legal

Assinatura do pesquisador
(carimbo ou nome Legível)

ANEXO C

FICHA DE AVALIAÇÃO

IDENTIFICAÇÃO:

Nome: _____ Idade _____

DN: _____ Local de nascimento: _____

Endereço: _____

Cidade: _____ Estado: _____

Telefone res.: _____ Tel. contato: _____

Escolaridade:

1º grau 2º grau 3º grau curso técnico incompleto completo

Profissão: _____

ANTECEDENTES PESSOAIS:

-Doenças não diabetes tuberculose tireoidopatia
doença respiratória neuropatia
fibrose cística do pâncreas Outras: _____

-DST não HPV Lues gonorréia HIV UNG
Outras: _____

-Orquiepididimite: não sim

-Lesão testicular: não orquite pós-caxumba esquerda direita
trauma esquerda direita
torção esquerda direita
Outras: _____

-Varicoceletoomia: não sim esquerda direita
-Criptorquidia não sim esquerda direita
Tratamento: não sim cirúrgico clínico

-Outra cirurgia: não vasectomia hérnia inguinal
hidroceletoomia Outras: _____

HÁBITOS:

-Tabagismo: não sim _____ cigarros/dia por _____ anos

Início aos _____ anos Parou há _____ anos

-Café: não sim _____ copos de cafezinho(____ litros)
dia semana mês

ANEXO D

A influência das espécies reativas de oxigênio na infertilidade masculina

The influence of reactive oxygen species on male infertility

Letícia Lucchese, Mírcia Garcez, Miriam Salvador, Eleonora Bedin Pasqualotto, Fábio Fimbach Pasqualotto



Letícia Lucchese

Letícia Lucchese possui graduação em Farmácia pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul (1994) e Especialização em Hematologia pela Universidade Federal do Rio de Janeiro (2001). Atualmente é Farmacêutica-Bioquímica da Prefeitura Municipal de Casinhas do Sul e mestranda da Universidade de Casinhas do Sul no projeto de pesquisa Infecção viral causada pelo *Papilloma vírus humano* e seu papel na qualidade seminal e no estresse oxidativo. Tem experiência profissional na área de Análises Clínicas com ênfase em Hematologia.

RESUMO

A infertilidade masculina é uma entidade multifatorial que abrange uma grande variedade de alterações, podendo ser congênita ou adquirida. A infertilidade idiopática pode ser causada pela excessiva produção de espécies reativas de oxigênio no plasma seminal, levando ao estresse oxidativo. Estudos têm demonstrado que os espermatozoides humanos possuem a capacidade de gerar espécies reativas de oxigênio quando incubados em ambiente aeróbio, sendo que as maiores fontes de espécies reativas de oxigênio no sêmen são leucócitos, espermatozoides com citoplasma residual e espermatozoides imaturos. A membrana plasmática dos espermatozoides é rica em ácidos graxos poliinsaturados sendo vulnerável ao processo de peroxidação lipídica, o que pode prejudicar a estrutura celular, motilidade, sobrevivência e funções metabólicas do espermatozoide. O estresse oxidativo pode induzir dano ao DNA espermático, podendo ser responsável pela aceleração do processo de apoptose da célula germinativa, levando a diminuição da concentração de espermatozoides e à aparente deterioração da qualidade seminal observada nas últimas 4 à 5 décadas. Entretanto dois fatores protegem o DNA espermático do ataque oxidativo: a característica de empacotamento do DNA e os antioxidantes presentes no plasma seminal. Conseqüentemente, as espécies reativas de oxigênio têm efeitos favoráveis ou prejudiciais sobre a função dos espermatozoides de acordo com sua natureza e concentração, assim como o momento e lugar da exposição. Estes achados mostram a importância do equilíbrio adequado entre antioxidantes e baixos níveis de ERO que são necessários para função espermática normal.

UNITERMOS: Infertilidade masculina; espécies reativas de oxigênio; antioxidantes; estresse oxidativo.

Introdução

Infertilidade é a inabilidade de um casal sexualmente ativo, sem a utilização de métodos contraceptivos, de estabe-

lecer gravidez no período de um ano¹, prazo no qual aproximadamente 90% dos casais o fazem. Sendo um fenômeno universal que acomete de 10% a 15% dos casais, independente dos fatores sociais, econômicos ou culturais². A avaliação de fertilidade é um fenômeno complexo e multifatorial que envolve a avaliação do casal. Em aproximadamente 50% dos casos de infertilidade conjugal, a causa esta relacionada pelo menos em parte com o homem^{1,3}.

As causas de infertilidade masculina podem ser geradas por vários fatores, sendo que de 30 a 40% dos casos não se descobrem às causas da dificuldade do casal engravidar. Portanto, infertilidade idiopática é uma situação extremamente

Instituto de Biometologia, Universidade de Casinhas do Sul, Casinhas do Sul, RS.
Endereço para correspondência:
Fábio Fimbach Pasqualotto
CONCEPTION - Centro de Reprodução Humana
Rua Pinheiro Machado, 2569, salas 23/24.
CEP 95020-170 Casinhas do Sul - RS, Brasil.
(54)3214-4095/3215-1695
fabio@conception-ra.com.br
www.conception-ra.com.br

séria, visto que representa uma elevada percentagem de homens inférteis que não podem ser tratados com as modalidades terapêuticas empíricas aplicadas atualmente^{4,5}. Uma das causas de infertilidade idiopática está relacionada ao estresse oxidativo (EO)⁶.

Alguns estudos sugerem que a excessiva e descontrolada produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) talvez possa ser um dos maiores fatores que levam a infertilidade masculina por causarem deterioração da qualidade e da função do espermatozóide^{7,8,9}. Portanto, o entendimento dos efeitos do EO no espermatozóide humano facilitará o diagnóstico de infertilidade masculina bem como as estratégias de tratamento específicas⁷. Este trabalho mostra alguns estudos sobre o papel das espécies reativas de oxigênio exercido sobre a fertilidade masculina.

Espécies reativas e antioxidantes

Os radicais livres (RL) podem ser definidos como estruturas altamente reativas, instáveis e que possuem um elétron desemparelhado na última camada eletrônica⁹. As espécies reativas do oxigênio (ERO) nem sempre são RL, mas estão envolvidas em reações químicas que geram esses radicais nos organismos vivos^{9,10}. Em contrapartida existem os antioxidantes que são compostos que funcionam como bloqueadores dos processos oxido-reduzidos desencadeados pelos radicais livres. Frequentemente, o termo "antioxidantes" é implicitamente restrito aos compostos inibidores da lipoperoxidação, entretanto, podem ser definido mais amplamente como "uma substância que, quando presente em baixas concentrações, comparada a outras que oxidam um substrato, previnem significativamente, a oxidação deste substrato"⁹. O dano causado pelas ERO é minimizado pelos sistemas de defesa antioxidante não enzimático ou enzimático, este último representado principalmente, pelas enzimas superóxido dismutase (Sod), catalase (Cat), glutatona-peroxidase (GPx) e glutatona-redutase (GR)¹¹.

A detoxificação das espécies reativas do oxigênio (ERO) envolve um mecanismo de elevada sincronia e que atua de forma altamente cooperativa. A regulação do sistema de defesa antioxidante enzimático depende principalmente de seu substrato (radicais livres e espécies reativas do oxigênio), da produção de co-substratos e da afinidade, seletividade e especificidade por este substrato¹².

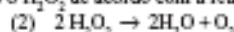
Entre as principais enzimas antioxidantes, detectadas em espermatozoides de diferentes espécies animais, esta a superóxido dismutase - Sod (EC 1.15.1.1)^{13,14}. Os radicais superóxido ($O_2^{\cdot-}$) são dismutados pela ação desta enzima, produzindo peróxido de hidrogênio e oxigênio molecular (O_2) conforme a reação 1:



Em células eucariotas há várias isoenzimas do tipo Sod, geralmente responsáveis por compartimentos celulares distintos, podendo conter cobre, zinco, ferro ou manganês em

seus sítios ativos¹⁵. Atualmente três tipos de Sod estão bioquímica e molecularmente caracterizadas em mamíferos: Sod1 ou SodCuZn, codificada por um gene presente no cromossomo 21, foi a primeira enzima Sod a ser caracterizada⁹, Sod2 ou SodMn, codificada por um gene presente no cromossomo 6^{14,16}, Sod3 ou SodEC (Sod extracelular) codificada por um gene presente no cromossomo 4¹⁶. A atividade da Sod é regulada através de sua biossíntese, a qual depende da oxigenação tissular, como foi comprovado em ratas submetidas a tensões de oxigênio elevadas¹⁷. Aumentos na concentração de superóxido podem elevar os níveis das isoenzimas da Sod⁹.

Outra enzima detectada no espermatozóide de seres humanos e que neutraliza as ações prejudiciais do excesso de ERO é a catalase (Cat) (EC 1.11.1.6), a qual está presente no espermatozóide e plasma seminal, sendo codificada por um gene presente no cromossomo 11 é um tetrâmero formado por unidades idênticas, cada monômero contém um grupo prostético heme, ligado ao ferro em seu centro catalítico^{14,18}. Atua removendo o H_2O_2 de acordo com a reação 2:



A catalase tem grande capacidade de destruir H_2O_2 . Em termos de moléculas de H_2O_2 destruídas por minuto, por moléculas de enzima, ela é uma das mais ativas enzimas conhecidas. Porém, sua afinidade pelo H_2O_2 é baixa, sendo necessárias altas concentrações de H_2O_2 para que ela possa trabalhar rápido¹⁸.

Entre os antioxidantes não-enzimáticos incluem-se as vitaminas, carotenóides polifenóis, ácido úrico entre outros. Esses antioxidantes agem principalmente quebrando a cadeia das reações oxidativas, eliminando radicais livres ou quelando íons metálicos^{20,21}.

Estresse oxidativo (EO), é então caracterizado como o desequilíbrio entre a produção de ERO e sua neutralização pelos antioxidantes^{22,23,24,25,26}. De acordo com Aitken & Krausz o EO é primeiramente induzido pela geração excessiva de ERO por espermatozoides imaturos e morfológicamente defeituosos e/ou por leucócitos seminais ativados²⁷; lesando não apenas a fluidez da membrana plasmática, mas também a integridade do DNA nuclear dos espermatozoides²⁸. Outra possível fonte de EO inclui reação redox dos xenobióticos, depreciação de antioxidantes ou apoptose²⁹.

O espermatozóide possui poucos antioxidantes em seu citoplasma, tornando esta célula muito vulnerável aos danos causados pelas ERO³⁰. Felizmente, o plasma seminal é rico em antioxidantes, contribuindo desta forma para o equilíbrio entre produção e neutralização das ERO³⁰. Entre os antioxidantes presentes em elevadas concentrações no plasma seminal estão os grupos tiol, ácido ascórbico e ácido úrico e em quantidades substanciais a glutatona e alfa-tocoferol. O espermatozóide possui elevadas concentrações de grupos tióis, porém pequenas quantidades de ácido ascórbico, alfa-tocoferol, ácido úrico e glutatona³¹. Outras substâncias como proteínas (albumina) ou pequenas moléculas tais como hipotaurina, taurina e piruvato, podem agir como neutralizadoras das ERO no sêmen, protegendo assim contra o estresse oxidativo^{32,33}. Entretanto o principal antioxidante no líquido seminal dos homens férteis é a vitamina C (ácido ascórbico) contribuindo com até 65% de sua capacidade

de antioxidante³⁴. Sua concentração no líquido seminal chega a ser 10 vezes maior que no plasma sanguíneo³⁵.

Toda esta relação entre produção de espécies reativas de oxigênio e sua neutralização pelos antioxidantes é necessário para assegurar uma função espermática adequada para que se consiga o objetivo final que é a gravidez da parceira.

Infertilidade masculina

De maneira corriqueira, o diagnóstico de infertilidade masculina depende de uma avaliação descritiva dos parâmetros do ejaculado, com ênfase na concentração, motilidade e morfologia dos espermatozoides, sendo a morfologia de Tygerberg a mais importante para prever fertilidade. Porém é necessário enfatizar que a análise seminal não é um teste de fertilidade. Atualmente, o número absoluto de espermatozoides não prediz o prognóstico de fertilidade, por isso, testes *in vitro* foram desenvolvidos para monitorar a capacidade funcional dessas células^{36,37}.

De fato, a pobre qualidade seminal do ejaculado humano nos separa de muitos dos outros mamíferos³⁸. Mesmo em uma população de homens férteis, até 50% dos espermatozoides do ejaculado podem apresentar alterações na motilidade ou morfologia¹. Acredita-se que para acontecer a fertilização do gameta feminino pelo masculino, é necessário apenas um número mínimo de espermatozoides com movimentos progressivos e morfologicamente normais³⁹. Sharma e Agarwal relataram que a produção de ERO pelos espermatozoides, assim como outras células que vivem em condições aeróbicas, origina-se principalmente da atividade metabólica normal³⁴. Zini *et al.*, mostraram que os espermatozoides humanos possuem a capacidade de gerar ERO quando incubados em ambiente aeróbio⁴⁰.

Vários são os fatores associados à infertilidade masculina, no entanto trabalhos atuais têm despertado a atenção para o envolvimento das ERO como um dos maiores fatores envolvidos nesta patologia⁴¹. Existem muitas evidências de que os leucócitos (principalmente os Granulócitos Polimorfonucleares) são considerados a maior fonte produtora de ERO no plasma seminal^{21,42,43,44}. A geração de elevados níveis de ERO pelos leucócitos pode exercer um efeito deletério importante na função dos espermatozoides como indicado por uma redução importante na motilidade espermática e capacidade de penetração ocitária^{45,46}. Tortolero *et al.*, reportam a associação da leucospermia com redução do número e da motilidade dos espermatozoides⁴⁶.

O dano causado aos espermatozoides pode ser moderado se a infiltração leucocitária ficar confinada à próstata ou às vesículas seminais. Nestas circunstâncias, o espermatozoide apenas entra em contato com as ERO geradas pelos leucócitos no momento da ejaculação. Entretanto, se eles foram originados no epidídimo ou testículo, as ERO poderão interagir com a membrana espermática por um longo período, aumentando as possibilidades de danificar os espermatozoides.

Efeito das espécies reativas de oxigênio no espermatozoide

Em condições normais, as células somáticas contêm substâncias antioxidantes em seu citoplasma. Porém o espermatozoide, durante o período de maturação, perde a maioria de seu citoplasma, e, com isto, perde parte dos antioxidantes endógenos, ficando vulnerável à ação das ERO⁴⁷. Quando a espermatogênese se apresenta prejudicada, os mecanismos de extrusão citoplasmática tornam-se defeituosos e o espermatozoide liberado pelo epitélio germinativo possui uma grande quantidade de citoplasma residual^{30,31}. Acredita-se que a retenção de citoplasma residual pelo espermatozoide humano esteja correlacionada positivamente com a geração de ERO por meio de mecanismos mediados pela enzima citosólica glicose-6-fosfato desidrogenase, que regula a taxa do influxo de glicose pelo movimento da hexose monofosfato, a qual, por sua vez, controla a disponibilidade do NADPH intracelular³⁶.

O espermatozoide humano é altamente susceptível ao estresse oxidativo. Este processo induz a fragmentação do DNA em ambos os genomas, nuclear e mitocondrial além de desencadear o fenômeno da Peroxidação Lipídica (LPO)^{24,29,39}, afetando primariamente a estrutura e a função da membrana celular e, conseqüentemente, causar alterações importantes nas proteínas^{22,23,24}. O peróxido de hidrogênio é a principal ERO tóxica para os espermatozoides humanos. As concentrações moderadamente altas de peróxido de hidrogênio não afetam a viabilidade dos espermatozoides, porém os imobilizam, geralmente por esgotamento do ATP intracelular e diminuição na fosforilação das proteínas do axonema. As altas concentrações de peróxido de hidrogênio induzem a peroxidação lipídica e produzem a morte celular²¹.

As membranas celulares estão sujeitas ao ataque das ER por possuírem grande conteúdo de ácidos graxos poliinsaturados nos fosfolípidios, os quais são particularmente sensíveis a reações oxidativas²⁴. A natureza insaturada das moléculas (ligação dupla) predispõe os espermatozoides ao ataque das espécies reativas e a peroxidação lipídica (LPO) da membrana plasmática. Com a LPO, existe uma perda na fluidez da membrana espermática, prejudicando o bom funcionamento de espermatozoide e a sua fusão com o ócito^{24, 28, 46, 48}. Além disso, a LPO prejudica a troca iônica realizada pela membrana do espermatozoide, danificando a motilidade espermática normal^{25, 41, 46}, e sendo correlacionada com defeitos morfológicos do corpo dos gametas masculinos⁴⁷. Os danos peroxidativos induzem a formação de ERO, sendo uma das maiores causas da redução da viabilidade e fertilidade dos espermatozoides²¹.

Os espermatozoides possuem mitocôndrias abundantes, estas organelas são uma fonte habitual de ERO, nas mitocôndrias com disfunções a produção de ERO aumenta significativamente e estas moléculas por sua vez afetam a função mitocondrial dos espermatozoides. Esta relação pode se dar devido a dois fenômenos interconectados mutuamente: as ERO que lesam a membrana mitocondrial, e a membrana mitocondrial lesionada que aumenta a produção de ERO²¹.

As bases do DNA e as ligações fosfodiéster são suscetíveis ao estresse oxidativo e a peroxidação destas estruturas pode causar quebras e *cross-linkings* do DNA e resultar em interrupção da transcrição, tradução, e replicação do DNA. A quantidade de produtos da oxidação do DNA tem sido reportada como aumentando com a idade em certos órgãos e o dano oxidativo ao DNA tem sido citada por estar envolvido na patogênese do câncer, doença de Alzheimer, e mutações hereditárias. Kodama *et al.*, sugeriram que o dano genômico ao DNA do espermatozoide pode ser transmitido para a prole e levar ao aumento da incidência de abortos, anomalias fetais, e defeitos de nascimento³⁹. Portanto, um alto nível de dano oxidativo ao DNA do espermatozoide pode formar uma etiologia bioquímica potencialmente importante e estar envolvido no mecanismo da infertilidade masculina. Entretanto, existem ainda muito poucas informações disponíveis sobre os níveis de dano endógeno ao DNA em espermatozoides humanos, e permanece a ser determinado se um elevado nível de dano oxidativo ao DNA do esperma está associado com o processo patológico da infertilidade masculina.

Os exames seminais de rotina, os quais medem a concentração de espermatozoides, percentagem de motilidade e morfologia, não identificam defeitos sutis na arquitetura da cromatina do espermatozoide. Porém a integridade do DNA do espermatozoide é crucial para a correta transmissão da informação genética às futuras gerações. Evidências acumuladas sugerem que distúrbios na organização do material genômico no núcleo do espermatozoide são negativamente correlacionados com o potencial de fertilidade do espermatozoide. Uma série de estudos tem revelado que os níveis de quebras duplas do DNA estão aumentados em pacientes inférteis com parâmetros anormais de sêmen quando comparados a homens férteis. A mesma diferença foi também detectada em homens com infertilidade idiopática com uma rotina normal dos parâmetros de sêmen que tiveram um alto índice de fragmentação de DNA. Em recente estudo Sharma *et al.*, mostraram que espermatozoides de homens inférteis apresentam alta frequência de anormalidades cromossômicas, deficiente qualidade de empacotamento do DNA, aumento de quebras duplas e maior suscetibilidade para induzir a desnaturação por ácidos *in situ* do que espermatozoides de homens férteis⁴⁰. Estes achados corroboram com a preocupação de que doenças genéticas possam ser transmitidas via técnicas de reprodução assistida, intensificando assim o foco na integridade genômica.

Diversos ensaios têm sido desenvolvidos para avaliar a integridade do DNA e a maturidade da cromatina espermática. Estes ensaios baseiam-se no fato de que defeitos na estrutura da cromatina podem levar ao aumento da instabilidade do DNA e suscetibilidade a desnaturação por estresse. Atualmente, os ensaios mais usados para medir a fragmentação do DNA são: Túnel, Cometa e o ensaio da estrutura da cromatina do esperma (SCSA). Tentativas têm sido feitas para padronizar o ensaio cometa com sêmen humano e estabelecer sua relação com os dados dos ensaios SCSA e túnel. Espermatozoides de uma mesma alíquota foram analisados com os três ensaios e uma correlação significativa entre os resultados foi observada⁴¹. O ensaio cometa permite uma avaliação da quantidade de fragmentação do DNA em células individuais. Sendo uma téc-

nica rápida, simples, sensível e de baixo custo para mensurar e analisar as lesões além de detectar efeitos de reparo no DNA⁴². Nesta técnica pequenos fragmentos de DNA migram para fora do núcleo e o número de quebras por célula pode ser estimado através da extensão da migração. O teste do cometa alcalino provou ser muito mais sensível na detecção de baixos níveis de danos de DNA em espermatozoide humano⁴³.

Muitos estudos têm detectado anomalias no núcleo de espermatozoides do ejaculado, embora a extensão do dano esteja minuciosamente relacionada com a função espermática e infertilidade masculina, a origem de tal dano é ainda controversa⁴⁴.

Três fatores podem estar envolvidos na etiologia do dano ao DNA na linhagem germinativa: estresse oxidativo, deficiências em processos naturais como empacotamento da cromatina e apoptose abortiva⁴⁵.

Apoptose, também descrita como morte celular programada é um fenômeno fisiológico caracterizado por alterações morfológicas e bioquímicas que culminam no suicídio da célula⁴⁶, a ocorrência da apoptose na vida adulta ajuda no descarte de células com alterações. No contexto da reprodução masculina, a apoptose é responsável pelo controle da superprodução de gametas masculinos^{44,45}, sendo a chave reguladora da espermatogênese em estágios normais e patológicos. Contudo a questão a ser respondida é se a apoptose no espermatozoide é o resultado de um processo iniciado no nível de espermatogônia ou se isto ocorre durante a última fase da espermatogênese ou mesmo a nível testicular⁴⁶. Gandini *et al* demonstraram que a porcentagem de apoptose em homens normozoospermicos foi significativamente menor do que em homens com oligoasthenoteratozoospermia, doença de Hodgkin e neoplasia de testículo⁴⁷. Outro estudo mostrou significativa correlação entre níveis de apoptose em espermatozoides maduros e níveis de ERO no sêmen. Sentman *et al.*⁴⁸ sugeriram que a apoptose pode depender das ERO, baseados no achado de que o peróxido de hidrogênio induz apoptose em culturas celulares. Portanto existem evidências suficientes para sugerir que altos níveis de ERO resultam na liberação da proteína citocromo-C da mitocôndria, que ativa as caspases e induz a apoptose, por outro lado, Bcl-2 (gene inibidor da morte celular programada) protege as células da apoptose, provavelmente por um mecanismo que reduz a produção de ERO⁴⁹.

Estas evidências sugerem que em homens subfértis, a liberação do espermatozoide via apoptose não esta ocorrendo corretamente, portanto homens com parâmetros seminais alterados (morfologia, função bioquímica ou dano no DNA nuclear) podem apresentar uma apoptose imperfeita^{44,50}.

Muito embora na infertilidade masculina as ERO sejam conhecidas principalmente por seus efeitos deletérios na função espermática, existem evidências suficientes para apoiar a hipótese de que, em baixas e controladas concentrações, as espécies reativas participam nos mecanismos de sinalização da transdução⁵¹. Um aumento na concentração de O_2^- é um dos primeiros passos necessários para que aconteçam a indução e o desenvolvimento dos movimentos de hiperativação e o fenômeno de capacitação do espermatozoide⁵². As ERO facilitam a reação acrossômica por meio de um efeito estimulatório na fosfolipase

A_2 presente no espermatozóide humano³⁵. Esta enzima é estimulada pelo íon cálcio e peróxidos lipídicos presentes na membrana plasmática. Além disso, as ERO auxiliam na ativação da fosforilação da tirosina, desempenhando papel importante na mediação da ligação do espermatozóide ao óvulo³⁶.

Estes achados mostram a importância do equilíbrio adequado entre antioxidantes e baixos níveis de ERO que são necessários para função espermática normal⁴⁰.

Espécies reativas de oxigênio em homens férteis e inférteis

A função espermática prejudicada é uma causa geral e óbvia da infertilidade masculina, no entanto o descontrole e produção excessiva de ERO parecem ter um papel significativo como um dos maiores fatores que conduzem a um estado de infertilidade^{34,35,36,37}. Gil-Gusman *et al.*, mostraram que existe uma significativa variação de célula para célula com relação à produção de ERO, em razão da presença de espermatozóides em diferentes estágios de maturação, e que o dano oxidativo causado aos espermatozóides maduros pelas ERO produzidas por espermatozóides imaturos durante a migração pelos túbulos seminíferos para o epidídimo pode ser uma importante causa de infertilidade masculina³¹.

Estudos mostraram que níveis aumentados de ERO têm sido encontrados no sêmen de homens inférteis^{41,42,43}, e estes têm sido correlacionados com a diminuição da morfologia do espermatozóide, como indicado por uma baixa proporção de espermatozóides com morfologia normal no sêmen^{38,40}. Em recente estudo, Nallella *et al.* mostrou forte correlação negativa entre qualidade seminal (derivada de parâmetros seminais) e níveis de ERO em todos os pacientes com fatores masculinos de infertilidade⁵. A correlação aumenta significativamente com o aumento dos espermatozóides anormais e com a diminuição da motilidade⁴⁴. Isto vem de acordo com alguns pesquisadores que acreditam que as concentrações patológicas de ERO detectadas no sêmen de homens inférteis se devem mais provavelmente ao aumento da produção de ERO e não pela deficiência de enzimas antioxidantes no plasma seminal (Sod e Cat)^{45,46}. Entretanto outros estudos^{47,48,49}, sugerem que EO deve ser resultado da deficiente capacidade antioxidante seminal. Tendo em vista que, os níveis de Sod e Cat apresentaram correlação positiva com a concentração espermática e negativa com níveis de leucócitos seminais, e estes últimos apresentaram correlação inversa com motilidade⁴².

Um estudo prospectivo demonstrou que homens com altos níveis de ERO tinham sete vezes menos chance de estabelecer uma gravidez comparado àqueles com baixa geração⁴⁶. Sendo o dano oxidativo ao espermatozóide a maior causa de disfunção espermática. As defesas antioxidantes não enzimáticas totais foram inversamente relacionadas com LPO⁴¹ e os altos níveis de ERO associados com significativo aumento da produção de MDA³⁸.

Estudos sugerem a inclusão da avaliação rotineira da medida de ERO-CAT (espécies reativas de oxigênio-capacidade antioxidante total) como um novo parâmetro do EO, ten-

do em vista que a associação destes demonstrou significância superior na separação de homens férteis e inférteis do que a avaliação dos parâmetros em separado foi demonstrado que homens inférteis, independente da forma de diagnóstico idiopática ou fatores masculinos, possuíam níveis significativamente mais baixos de ERO-CAT, do que os controles⁴⁵. Servindo com importante fator de identificação dos pacientes inférteis com diagnóstico clínico de infertilidade masculina⁴⁷.

Portanto, os níveis de ERO no sêmen, são uma real preocupação, pois eles quando presentes em altos níveis são potencialmente tóxicos à qualidade e função do espermatozóide.

Conclusão

Aparentemente, existe uma relação direta entre níveis elevados de ERO e infertilidade masculina. Portanto o entendimento dos mecanismos envolvidos e pesquisas para alterar a relação entre produção e neutralização das ERO são de grande importância para que consigamos aumentar as chances de um casal vir a estabelecer gravidez.

ABSTRACT

Male infertility is a multifactorial entity covering a great variety of alterations. It may be congenital or acquired. Idiopathic infertility may be caused by excess production of reactive oxygen species in seminal plasma, leading to oxidative stress. Studies have shown that human sperm can generate reactive oxygen species when incubated in aerobic environments, and the main sources of reactive oxygen species in semen are leukocytes, sperm with residual cytoplasm and immature sperm. The plasma membrane of sperm is rich in polyunsaturated fatty acids, and it is vulnerable to the lipid peroxidation process that may damage the cell structure, motility, survival and metabolic functions of the sperm. Oxidative stress may induce damage to the spermatid DNA, and could be responsible for speeding-up the process of germ cell apoptosis, leading to a reduction in the sperm concentration, and to the apparent deterioration of the seminal quality observed in the last 4 to 5 decades. However, two factors protect the sperm DNA from oxidative attack: the characteristic of DNA packaging, and the antioxidants present in the seminal plasma. Consequently, the reactive oxygen species have favorable or harmful effects on the sperm function, depending on their nature and concentration, as well as the time and place of exposure. These findings show the importance of an adequate balance between antioxidants and low levels of ROS needed for normal sperm function.

UNITERMS: Male infertility; reactive oxygen species; antioxidants; oxidative stress.

Referências bibliográficas

- World Health Organization (WHO). Laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction. Cambridge, Cambridge University Press; 1999.
- Galarneau GJ, Nagler HM. Cost-effective infertility therapies in the '90s: To treat or to cure? *Contemp Urol* 1999; 11: 32-45.
- Nallella KP, Sharma RK, Allamaneni SSR, Agarwal A. Identification of male factor infertility using a novel semen quality score and reactive oxygen species levels. *Clinics* 2005; 60: 317-24.
- Kadze R, Chan PJ, Jacobson JD, Corselli JU, King A. Temperature variable and the efficiency of sperm mediated transfection of HPV16 DNA into cells. *Asian J Androl* 2002; 4: 169-73.
- Kapranos N, Petrakou E, Anastasiadou C, Kotronias D. Detection of herpes simplex virus, cytomegalovirus, and Epstein-Barr virus in the semen of men attending an infertility clinic. *Fertil Steril* 2003; 79: 1566-70.
- Fraczek M, Kurpisz M. The redox system in human semen and peroxidative damage of spermatozoa. *Postepy Hig Med Dosw (Online)* 2005; 59:523-34.
- Agarwal A, Prabakaran S, Allamaneni SS. Relationship between oxidative stress, varicocele and infertility: a meta-analysis. *Reprod Biomed* 2006; 12(5):630-3.
- De Iulius GN, Wingate JK, Koopers AJ, McLaughlin EA, Aitken RJ. Definitive evidence for the nonmitochondrial production of superoxide anion by human spermatozoa. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; 91(5):1968-75.
- Halliwell B, Gutteridge JMC. Free radicals in biology and medicine. Oxford University Press: New York 2000; 936.
- Salvador M, Henriques JAP. Radicais livres e a resposta celular ao estresse oxidativo. In: Garcez M, Bordin D, Peres W, Salvador M. Radicais livres e espécies reativas. Ed. Ulbra: Canoas 2004.
- Bonnefoy M, Patricot MC, Lacour JR. Relation between physical activity, muscle function and IGF-1, testosterone and DHEAS concentrations in the elderly. *Rev Med Interne* 2002; 23(10):819-27.
- Sies H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants, *Experimental Physiology* 1997; 82(2): 291-5.
- Alvarez JG, Touchstone JC, Blasco L, Storey BT. Spontaneous lipid peroxidation and production of hydrogen peroxide and superoxide in human spermatozoa. Superoxide dismutase as major enzyme protectant against oxygen toxicity. *J Androl* 1987; 8: 338-48.
- Meier B, Habermehl GG. Evidence for superoxide dismutase and catalase in molluscs and release of reactive oxygen species. *Arch Biochem Biophys* 1990; 15: 74-9.
- Fridovich I. Oxygen toxicity: a radical explanation. *J Exp Biol* 1998; 201: 1203-1209.
- Zelko IN, Mariani TJ, Folz RJ. Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the Cu-Zn-Sod (Sod1), Mn-Sod (Sod2) and EC-Sod (Sod3) gene structures, evolution, and expression. *Free Radic Biol Méd* 2002; 33(3): 337-49.
- Crapo JD, Tierney DF. Superoxide dismutase and pulmonary oxygen toxicity. *Am J Physiol* 1974; 226: 1401-1407.
- Foote RH, Hare E. High catalase content of rabbit semen appears to be inherited. *J Androl* 2000; 21: 664-8.
- Lodato RF. Oxygen Toxicity. In: Tobin, M.J. Principles and Practice of Mechanical Ventilation. Mc Graw-Hill 1994: 837-855.
- Halliwell B, Gutteridge JM. Lipid peroxidation in brain homogenates: the role of iron and hydroxyl radicals. *J Neurochem* 1997; 69(3):1330-1.
- Sánchez-Moreno S, Laurauri JA, Calixto-Saura F. Free radical scavenger capacity and inhibition of lipid oxidation of wines, grapes juices and related polyphenolic constituents. *Food Res Internat.* 1999; 32: 407-412.
- Sikka SC. Oxidative stress and role of antioxidants in normal and abnormal sperm function. *Front Biosci* 1996; 1: 78-86.
- Pasqualotto FF, Sharma RK, Nelson DR, Thomas AJr, Agarwal A. Oxidative stress in normospermic men undergoing infertility evaluation. *J Androl* 2001; 22: 316-22.
- Pasqualotto FF, Sharma RK, Kobayashi H, Nelson DR, Thomas AJr, Agarwal A. Poor semen quality and ROS-TAC scores in patients with idiopathic infertility. *Póster - 97º Encontro anual da Associação Americana de Urologia* 2001; Anaheim, CA, EUA, junho 2-7.
- Saleh RA, Agarwal A. Oxidative Stress and Male Infertility: From Research Bench to Clinical Practice. *J Androl* 2002; 23:6.
- Agarwal A, Prabakaran SA. Mechanism, measurement, and prevention of oxidative stress in male reproductive physiology. *Indian J Exp Biol* 2005; 43(11):963-74.
- Aitken RJ, Krausz C. DNA damage and Y chromosome. *Reproduction* 2001; 122: 497-506.
- Aitken RJ. The Amoroso lecture. The human spermatozoon - a cell in crisis? *J Reprod Fertil* 1999; 115:1-7.
- Aitken RJ, Baker MA. Oxidative stress, sperm survival and fertility control. *Mol Cell Endocrinol* 2006; 250(1-2):66-9.
- Cornhaire F, Zalata A, Christophe A, Mahmoud A, Depuydt C, Dhooze W. Which efforts towards conservative treatment of male infertility will be successful? Reactive oxygen species, antioxidants, and sperm phospholipids. *Androl* 1999; 31: 295-6.
- Potts RJ, Jefferies TM, Notarianni LJ. Antioxidant capacity of epididymis. *Hum Reprod* 2001; 14(10): 2513-16.

32. Lewis MES, Sterling LSE, Young SI, Thompson W. Comparison of individual antioxidants of sperm and seminal plasma in fertile and infertile men. *Fertil Steril* 1997; 67(1): 142-7.
33. McCall MR, Frei B. Can antioxidant vitamins materially reduce oxidative damage in humans? *Free Radical Biomed* 1999; 26(7-8): 1034-53.
34. Agarwal A. Role of antioxidants in the treatment of men infertility: an overview of the literature. *Reprod Biomed* 2004; 8: 616-27.
35. Agarwal A, Ferreira R. Estrés oxidativo y administración de antioxidantes en la esterilidad masculina. *Antioxidantes y Calidad de Vida* 2004; 8:4-11.
36. Sharma RK, Agarwal A. Role of reactive oxygen species in male infertility. *Urology* 1996; 48: 835-50.
37. Ombelet W, Wouters E, Boels L, Cox A, Janssen M, Spiessens C, Vereecken A, Bosmans E, Steeno O. Sperm morphology assessment: diagnostic potential and comparative analysis of strict or WHO criteria in a fertile and a subfertile population. *Int J Androl* 1997; 20(6):367-72.
38. Birkhead T. The role of sperm competition in reproduction. In: Glover T D, Barratt CLR. Ed. *Male fertility and infertility*, Cambridge, UK, Cambridge University Press 1999; 18-33.
39. Aitken RJ. Sperm function tests and fertility. *Int J Androl* 2006; 29(1):69-75.
40. Zini A, Garrels K, Phang D. Antioxidant activity in the semen of fertile and infertile men. *Urology* 2000; 55(6): 922-6.
41. Dokmeci, D. Oxidative stress, male infertility and the role of carnitines. *Folia Med (Plovdiv)*, 2005; 47(1):26-30.
42. Oschendorff FR. Infections in the male genital tract and reactive oxygen species. *Hum Reprod Update* 1999; 5(5): 399-420.
43. Pasqualotto FF, Kobayashi H, Daitch JA, Agarwal A, Thomas AJR. Detection of testicular cancer in men presenting with infertility. *Urology Times* 2000; 28: 24.
44. Sharma RK, Pasqualotto FF, Nelson DR, Thomas AJR, Agarwal A. Relationship between seminal white blood cell counts and oxidative stress in men treated at an infertility clinic. *J Androl* 2001; 22: 575-83.
45. Lemkecher T, Dartigues S, Vaysse J, Kulski O, Barraud-Lange V, Gattegno L, Wolf JP. Leucocytospermia, oxidative stress and male infertility: facts and hypotheses. *Gynecol Obstet Fertil* 2005; 33(1-2): 2-10.
46. Aitken RJ, Irvine DS, Wu FC. Prospective analysis of sperm-oocyte fusion and reactive oxygen species generation as criteria for the diagnosis of infertility. *Am J Obstet Gynecol* 1991; 164: 542-51.
47. Sharma RK, Pasqualotto FF, Goyal K, Thomas AJR, Nelson DR, Agarwal A. Relationship between oxidative stress and semen quality in infertile men. In *asa annual meeting*, 95. Abstract. p.1349. Dallas, 1999.
48. Baker MA, Aitken RJ. Reactive oxygen species in spermatozoa: methods for monitoring and significance for the origins of genetic disease and infertility. *Reprod Biol Endocrinol* 2005; 29(3):67.
49. Tortolero I, Duarte OJM, Pamplona CM, Alvarez GE, Amta-Bellabarba G, Regadera J, Leiva GO. The effect of seminal leukocytes on semen quality in subfertile males with and without varicocele. *Arch Esp Urol* 2004; 57(9): 921-28.
50. Zini A, Buckspan M, Jamal M, Jarvi K. Effect of varicocelectomy on the abnormal retention of residual cytoplasm by human spermatozoa. *Hum Reprod* 1999; 14(7): 1791-3.
51. Gil-Guzman E, Ollero M, Sharma RK, Lopez MC, Alvarez JG, Agarwal A. Differential production of reactive oxygen species by subsets of human spermatozoa at different stages of maturation. *Hum Reprod* 2001; 16: 1922-30.
52. Twigg J, Fulton N, Gómez E, Irvine DS, Aitken RJ. Analysis of the impact of intracellular reactive oxygen species generation on the structural and functional integrity of human spermatozoa: lipid peroxidation, DNA fragmentation and effectiveness of antioxidants. *Hum Reprod* 1998; 13: 1429-36.
53. Zalata AA, Christophe AB, Depuydt CE, Schoonjans F, Combaire FH. The fatty acid composition of phospholipids of spermatozoa from infertile patients. *Mol Hum Reprod* 1998; 4: 111-8.
54. Storey BT, Alvarez JG, Thompson KA. Human sperm glutathione reductase activity in situ reveals limitation in the glutathione antioxidant defense system due to supply of NADPH. *Mol Reprod Dev* 1998; 49: 400-7.
55. Griveau JF, Le Lannou D. Reactive oxygen species and human spermatozoa. *J Androl* 1997; 20:61-9.
56. Kobayashi T, Miyazaki T, Natori M, Nozawa S. Protective role of superoxide dismutase in human sperm motility: superoxide dismutase activity and lipid peroxide in human seminal plasma and spermatozoa. *Hum Reprod* 1991; 6(7): 987-91.
57. Zayas LEA, Benitez GM, Ynez LAP, Pérez YQ. Papel del estrés oxidativo en la infertilidad masculina. *Rev Cubana Invest Biomed* 2000; 19(3): 202-05.
58. Alvarez CA, Moraes GV. Efeitos da Selenometionina e vitamina C sobre o sêmen. *Sábios* 2006; 1(1): 42-51.
59. Kodama H, Yamaguchi R, Fukuda J, Kasai H, Tanaka T. Increased oxidative deoxyribonucleic acid damage in the spermatozoa of infertile male patients. *Fertil Steril* 2001; 68(3):519-24.
60. Sharma RK, Said A, Agarwal A. Sperm Dna damage and its clinical relevance in assessing reproductive outcome. *Asian J Androl* 2004; 6: 139-148.
61. Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res* 1988; 175(1):184-91.

62. Duty SM, Singh NE, Ryan L, Chen Z, Lewis C, Hunag T. Reliability of the comet assay in cryopreserved human sperm. *Human Reprod* 2001;17: 1274-80.
63. Vaux DL, Flavell RA. Apoptosis genes and autoimmunity. *Curr Opin Immunol* 2000;12: 719-24.
64. Sakkas D, Mariethoz E, Manicardi G, Bizzaro D, Bianchi P, Bianchi U. Origin of DNA damage in ejaculated human spermatozoa. *Rev Reprod* 1999;4:31-7.
65. Sinha Hikim AP, Swerdloff RS. Hormonal and genetic control of germ cell apoptosis in the testis. *Rev Reprod* 1999;4: 38-47.
66. Agarwal A, Saleh RA, Bedaiwy MA. Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of Hum Reprod. *Fertil Steril* 2003; 79:829-843.
67. Gandini L, Lombardo F, Paoli D, Caponecchia L, Familiari G, Verlengia C, et al. Study of apoptotic DNA fragmentation in human spermatozoa. *Hum Reprod* 2000; 15:830-9.
68. Sentman CL, Shutter JR, Hockenbery D, Kanagawa O, Korsmeyer SJ. Bcl-2 inhibits multiple forms of apoptosis but not negative selection in thymocytes. *Cell* 1991;67:879-88.
69. Kane DJ, Sarafian TA, Anton R, Hahn H, Gralla EB, Valentine JS, et al. Bcl-2 inhibition of neural death: decreased generation of reactive oxygen species. *Science* 1993;262:1274-7.
70. Huszar G, Sbracia M, Vigue L, Miller DJ, Shur BD. Sperm plasma membrane remodeling during spermiogenic maturation in men: relationship among plasma membrane beta 1,4-galactosyltransferase, cytoplasmic creatine phosphokinase and creatine phosphokinase isoform ratios. *Biol Reprod* 1997;56: 1020-4.
71. Sikka SC. Oxidative stress and role of antioxidants in normal and abnormal sperm function. *Front Biosci* 1996; 1:78-86.
72. Miesel R, Drzejczak PJ, Kurpisz M. Oxidative stress during the interaction of gametes. *Biol Reprod* 1993; 49: 918-23.
73. Riley JC, Behrman HR. Oxygen radicals and reactive oxygen species in reproduction. *Proc Soc Exp Biol Med* 1991; 198: 781-91.
74. Alkan I, Simsek F, Haklar G, Keremcioglu E, Ozveri H, Yalcin S, Akdas A. Reactive oxygen species production by the spermatozoa of patients with idiopathic infertility: relationship to seminal plasma antioxidants. *J Urol* 1997; 157: 140-3.
75. Lewis SEM, Boyle PMB, McKinney KA. Total antioxidant capacity of seminal plasma is different in fertile and infertile men. *Fertil Steril* 1995;64:868-70.
76. Aitken RJ, Clarkson JS, Fishel S. Generation of reactive oxygen species, lipid peroxidation and human sperm function. *Biology of Reproduction* 1989; 40: 183-97.
77. Padron OF, Brackett NL, Sharma RK, Lynne CM, Thomas AJr, Agarwal A. Seminal reactive oxygen species and sperm motility and morphology in men with spinal cord injury. *Fertil Steril* 1997; 67:1150-20.
78. Zini A, De Lamirande E, Gagnon C. Reactive oxygen species in semen of infertile patients: levels of superoxide dismutase and catalase-like activities in seminal plasma and spermatozoa. *Int J Androl* 1993; 16:183-8.
79. Gomez E, Buckingham DW, Brindle J, Lanzafame F, Irvine DS, Aitken RJ. Development of an image analysis system to monitor the retention of residual cytoplasm by human spermatozoa: correlation with biochemical markers of the cytoplasmic space, oxidative stress, and sperm function. *J Androl* 1996; 17: 276- 87.
80. Aziz N, Saleh RA, Sharma RK, Lewis-Jones I, Esfandiari N, Agarwal A. Novel association between sperm reactive oxygen species production, sperm morphological defects, and the sperm deformity index. *Fertil Steril* 2004; 81: 349-54.
81. Smith R, Vantman D, Ponce J. Total antioxidant capacity of human seminal plasma. *Hum Reprod* 1996; 11: 1655-60.
82. Pasqualotto FF, Pasqualotto EB, Umezur FM, Salvador M. Níveis de antioxidantes enzimáticos no plasma seminal de homens férteis e inférteis. *Reproducción Humana* 2006; 11-18.
83. Sharma RK, Pasqualotto FF, Nelson DR, Thomas AJr, Agarwal A. The reactive oxygen species-total antioxidant capacity score is a new measure of oxidative stress to predict male infertility. *Hum Reprod* 1999; 14(11): 2801-07.