



Universidade do Estado do Rio de Janeiro
Centro Biomédico
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

Paula Fontoura Coelho de Souza

Investigação da infertilidade masculina

Rio de Janeiro

2016

Paula Fontoura Coelho de Souza

Investigação da infertilidade masculina



Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-graduação em Biologia Humana e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientadora: Prof.^a Dra. Cristiane da Fonte Ramos

Rio de Janeiro

2016

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

S729 Souza, Paula Fontoura Coelho de.
Investigação da infertilidade masculina / Paula Fontoura Coelho de Souza –
2016.
67 f.

Orientadora: Cristiane da Fonte Ramos

Tese (Doutorado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de
Biologia Roberto Alcântara Gomes. Pós-graduação em Biologia Humana e
Experimental.

1. Espermatozoides – Teses. 2. Leptina. 3. Liraglutida. 4. Estresse oxidativo –
Teses. 5. Fertilidade. I. Ramos, Cristiane da Fonte. II. Universidade do Estado do
Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. III. Título.

CDU 611-013.11

Bibliotecária: Angela da Silva Velho - CRB7/4780

Autorizo apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial
desta tese, desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Paula Fontoura Coelho de Souza

Investigação da infertilidade masculina

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-graduação em Biologia Humana e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 29 de julho de 2016.

Banca Examinadora:

Prof.^a Dra. Cristiane da Fonte Ramos (Orientadora)
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Prof. Dr. Roberto Soares de Moura
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Prof. Dr. George Queiroz Vaz
Hospital Universitário Pedro Ernesto - UERJ

Prof. Dr. Luiz Felipe Bittencourt de Araújo
Universidade Federal Fluminense

Prof.^a Dra. Claudia Alessandra Fortes Aiub
Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro

Rio de Janeiro

2016

DEDICATÓRIA

À minha mãe, por estar comigo sempre, me apoiar e me inspirar! Obrigada, melhor mãe do mundo!!

AGRADECIMENTOS

Após bater em algumas portas pedindo orientação para realizar meu doutorado com o tema de “espermatozoides” (do qual eu não abriria mão), meu primeiro agradecimento é para a minha professora Cristiane da Fonte Ramos. Sem você, meu sonho não seria possível! Obrigada por sua confiança, por sua dedicação como orientadora, por estar sempre disponível e por ter se tornado uma parceira em projetos que tenho para o futuro! Minha mente borbulha de idéias e os sptz nadam na minha mente!!!

Ao VIDA Centro de Fertilidade, por tornar este trabalho possível, através da colaboração feita com a UERJ. Obrigada às “Cecílias” (Cecília Cardoso e Erthal) e ao Paulo Gallo por me receberem e pelo carinho durante todo esse tempo!

Aos amigos que fiz no VIDA, Ana, Caio, Keren, Raysa, Mari e Cristal. Ana e Caio, muito obrigada por toda a paciência ao me passarem seus conhecimentos sobre o mundo da Reprodução Assitida, nunca esquecerei o carinho de vocês! Keren, Raysa, Mari e Cristal, nossa rotina não poderia ser melhor sem vocês!! Foi tudo perfeito!!

Ao meu namorado, André, por aturar meus muitos momentos em 4 anos de TPM (aproximadamente 50 TPMs durante o doutorado). Por seu carinho e, principalmete, pelo que considero o mais importante: por embarcar comigo em tudo!!!! Te amo!!

Às minhas amigas, Grazi, Laíses, Wandinha, Marcelinha, Claudinha, Daniel! Que me ajudaram diretamente no meu trabalho e que me acalmaram em momentos de desespero!

À minha linda família, por me apoiar e me incentivar em todas as idéias que tenho! Por estarem sempre na torcida, comemorando cada etapa de conquista!!!

Aos meus avós, que participam de tudo, que me dão todo o carinho do mundo!!

À CAPES, por financiar o período do Doutorado.

- Vou colocar o sr. aqui na salinha de coleta e te passar as orientações... O sr. Já fez algum espermograma antes?
- Sim, eu estou fazendo este exame porque minha mulher não consegue engravidar.
 - Como estava seu exame? Concentração... motilidade... morfologia...?
- Está tudo ok. Estão nadando bem... não taaanto, mas alguns nadam sim. Quantidade tem bastante, está um pouco abaixo da média... Morfologia??
(oligoastenoteratospermia acentuada)

RESUMO

SOUZA, Paula Fontoura Coelho de. *Investigação da infertilidade masculina*. 2016. 67 f. Tese (Doutorado em Biologia Humana e Experimental) - Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2016.

A leptina e seu receptor estão presentes nos espermatozoides, no entanto, seu papel sobre a função espermática ainda é controverso. Trabalhos recentes mostram que a leptina diminui o estresse oxidativo, que é considerado uma causa de infertilidade e tem efeitos deletérios sobre a fragmentação do DNA (fDNA) espermático e a sobrevivência dos espermatozoides após o descongelamento. Assim como a leptina, a literatura tem apontado o hormônio peptídico similar ao glucagon (GLP-1) como um potencial regulador da função reprodutiva. Este hormônio tem sido utilizado para o tratamento de diabetes tipo 2, porém, devido à sua curta meia vida, foram criados agonistas do receptor do GLP-1 com maior meia vida, como é o caso da liraglutida. O presente estudo relatou um caso de azoospermia relacionado ao uso do liraglutida, dessa forma, se fez necessário aprofundar a avaliação de seus efeitos sobre o sistema reprodutor masculino. O objetivo deste estudo foi investigar a função dos hormônios leptina e liraglutida sobre a função espermática. Participaram deste estudo 114 indivíduos normospérmicos provenientes de laboratório especializado em reprodução assistida. Para a avaliação do efeito da leptina, as amostras de espermatozoides sofreram congelamento e descongelamento, com e sem capacitação, seguida por incubação em meio acrecido ou não com leptina. Antes e após o congelamento, foi realizada fDNA através da técnica de *Sperm Chromatin Dispersion*. Os parâmetros de estresse oxidativo foram mensurados através de espectrofotometria. O caso do paciente azoospermico com uso do liraglutida foi publicado em forma de relato de caso e para entender o processo pelo qual a liraglutida pode ter afetado a espermatogênese, se fez necessário avaliar a presença do receptor do GLP-1 nos espermatozoides humanos e testículos de camundongos através da técnica de *Western Blotting*, pois este dado ainda não foi descrito na literatura. Foi realizada ainda a incubação *in vitro* de espermatozoides com liraglutida e analisado seu efeito na função espermática através da análise das taxas de motilidade e vitalidade. Para análise estatística dos resultados, foi utilizado o teste *t* pareado para comparar os grupos antes e após o congelamento, também foi utilizado o teste ANOVA de medidas repetidas, seguida pelo pós teste de Holm-Sidak para comparar os grupos antes e após incubação dos espermatozoides com diferentes concentrações de leptina e de liraglutida. Considerou-se estatisticamente significativo quando $p \leq 0,05$. Foi observado um aumento significativo da fDNA espermático após o descongelamento, comparado às amostras a fresco. A adição de leptina às amostras capacitadas antes do congelamento reduziu as taxas de fDNA e aumentou a atividade de enzimas antioxidantes. Detectamos a expressão protéica do receptor do GLP-1 em espermatozoides humanos e em testículos de camundongos e a liraglutida reduziu a taxa de motilidade espermática. A leptina e liraglutida estão envolvidas na regulação espermática. A adição de leptina às amostras capacitadas reduziu a fDNA e o estresse oxidativo melhorando a qualidade espermática no pós-descongelamento. Verificamos que tanto os espermatozoides humanos, quanto os testículos de camundongos, expressam o receptor do GLP-1. A incubação *in vitro* dos espermatozóides com liraglutida reduziu a taxa de motilidade progressiva, e o relato de caso sugere que a liraglutida causou uma interrupção da espermatogênese, sendo restabelecida com a suspensão do medicamento.

Palavras-chave: Espermatozoides. Leptina. Liraglutida. Estresse oxidativo. Fertilidade.

ABSTRACT

SOUZA, Paula Fontoura Coelho de. *Male infertility investigation*. 2016. 67 f. Tese (Doutorado em Biologia Humana e Experimental) - Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2016.

Leptin and its receptor are present in spermatozoa, however, its role on sperm function is still controversial. Recent studies show that leptin reduces oxidative stress, which is considered an infertility cause and has deleterious effects on sperm DNA fragmentation (DNAf) and sperm survival after thawing. As well as leptin, literature has indicated the hormone glucagon-like peptide (GLP-1) as a potential regulator of reproductive function. This hormone has been recommended for type 2 diabetes treatment. However, because of its short half life, GLP-1 agonists have been created with a longer half life, for example, liraglutide. This study reported a case of azoospermia related to liraglutide use, therefore, we found important to evaluate its effects on male reproductive system. The aim of this study was to investigate the function of the hormones leptin and liraglutide on sperm function. Participated on this study 114 normospermic patients from a specialized assisted reproductive laboratory. For the evaluation of leptin effect, sperm samples were frozen and thawed, with or without capacitation, followed by incubation in culture media supplemented or not with leptin. fDNA was evaluated through *Sperm Chromatin Dispersion* assay, before and after freeze-thaw cycle. The case of the azoospermic patient after liraglutide use was published as a case report and, for better understanding the mechanisms by which liraglutide could have affected spermatogenesis, we evaluated GLP-1 expression in human spermatozoa and mouse testis through *Western Blotting* technique, once these data are not present in literature. We also incubated sperm and liraglutide in vitro to study its possible effects on sperm function, by analysis of motility and vitality rates. For statistical analysis, we used paired *t* test to compare groups before and after freeze-thaw cycle, repeated measures ANOVA followed by Holm-Sidak test to compare groups before and after incubation with different concentrations of leptin and liraglutide hormones. Statistical significance was considered when $p \leq 0,05$. This study showed a significant increase in post-thaw sperm DNAf, compared to fresh samples. The addition of leptin to capacitated samples before freezing reduced DNAf rates and enhanced sperm antioxidant enzymes activity. We detected the presence of GLP-1 receptor in human spermatozoa and in mouse testis. Liraglutide reduced sperm motility, but not sperm vitality. Through the analysis of the hormones leptin and GLP-1, we found that both are involved in sperm regulation. Leptin incubation reduced DNAf and oxidative stress, improving post-thaw sperm quality. We detected that both human sperm and mouse testis express GLP-1 receptor. In vitro incubation of sperm with liraglutide reduced progressive motility rates, and the case report suggests that liraglutide has led to an arrest on spermiogenesis, which was restored after medication interruption.

Keywords: Spermatozoa. Leptin. Liraglutide. Oxidative stress. Fertility.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Fases da espermiogênese.....	14
Quadro 1 –	Parâmetros seminais macroscópicos.....	15
Quadro 2 –	Parâmetros seminais microscópicos e classificação da amostra.....	15
Figura 2 –	Fragmentação do DNA espermático.....	18
Figura 3 –	Regulação hormonal do sistema reprodutor.....	19
Figura 4 –	Expressão de leptina e de seu receptor.....	33
Figura 5 –	Motilidade e vitalidade espermática em diferentes concentrações de leptina.....	34
Figura 6 –	Validação do teste de fragmentação do DNA no laboratório.....	34
Figura 7 –	Taxas de fragmentação do DNA espermático antes e após congelamento.....	35
Figura 8 –	Taxas de fragmentação do DNA em sêmen bruto, capacitado e capacitado com leptina.....	36
Figura 9 –	Dano oxidativo em amostras capacitadas com e sem leptina.....	37
Figura 10 –	Atividade das enzimas antioxidantes em amostras capacitadas com e sem leptina.....	38
Figura 11 –	Motilidade e vitalidade espermática em diferentes concentrações de leptina.....	38
Figura 12 –	Expressão do receptor de GLP-1 em espermatozoides.....	39
Figura 13 –	Motilidade e vitalidade espermática em diferentes concentrações de liraglutida.....	39
Figura 14 –	Expressão do receptor de GLP-1 em testículo de camundongos.....	40
Tabela 1 –	Parâmetros espermáticos do paciente azoospérmico em uso de liraglutida.....	41

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DGC	Gradiente de Diferentes Densidades
DNA	Ácido desoxirribonucléico
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
FDA	Food and Drugs Administration
fDNA	Fragmentação do DNA
FSH	Hormônio Folículo Estimulante
GLP-1	Peptídeo Similar ao Glucagon
GnRH	Hormônio Liberador de Gonadotrofina
GPx	Glutathione Peroxidase
HTF	Human Tubal Fluid
ICSI	Injeção Intracitoplasmática de Espermatozoide
LH	Hormônio Luteinizante
MDA	Malondialdeído
ObR	Receptor de Leptina
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	Solução Tampão Fosfato
VPN	Valor Preditivo Negativo
VPP	Valor Preditivo Positivo
SCD	Dispersão da Cromatina do Espermatozoide
SCSA	Ensaio de Estrutura da Cromatina Espermática
SH	Sulfidril
SOD	Superóxido Dismutase
TBARS	Substâncias que Reagem ao Ácido Tiobarbitúrico
TUNEL	Marcação da porção terminal do ácido nucléico

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	12
1	A INFERTILIDADE CONJUGAL	12
1.1	Infertilidade masculina	13
1.1.1	<u>A espermatogênese</u>	13
1.1.2	<u>O espermograma</u>	14
1.1.3	<u>O estresse oxidativo</u>	16
1.1.4	<u>Fragmentação do DNA espermático</u>	16
1.2	Hormônios que regulam a fertilidade	18
1.2.1	<u>Regulação hormonal clássica</u>	18
1.2.2	<u>Leptina</u>	19
1.2.3	<u>GLP-1</u>	20
1.3	Criopreservação de espermatozoides	21
2	OBJETIVOS	23
2.1	Objetivo geral	23
2.2	Objetivos específicos	23
3	METODOLOGIA	24
3.1	Seleção de pacientes	24
3.2	Coleta seminal	24
3.3	Análise seminal	24
3.4	Classificação dos pacientes segundo os critérios da OMS	25
3.5	Capacitação espermática	26
3.6	Incubação dos espermatozoides com leptina	26
3.6.1	<u>Expressão da leptina e de seu receptor nos espermatozoides</u>	26
3.6.2	<u>Padronização da dosagem de leptina</u>	27
3.6.3	<u>Validação da técnica de fDNA espermático</u>	27
3.6.4	<u>fDNA espermático</u>	27
3.6.5	<u>Mecanismos pró-oxidantes em espermatozoides</u>	28
3.6.5.1	<u>Peroxidação lipídica</u>	28
3.6.5.2	<u>Sulfidrilção de proteínas</u>	28
3.6.6	<u>Mecanismos antioxidantes em espermatozoides</u>	28

3.6.6.1	SOD.....	29
3.6.6.2	Catalase.....	29
3.6.6.3	GPx.....	30
3.6.7	<u>Motilidade e vitalidade</u>	30
3.6.8	<u>Análise estatística</u>	30
3.7	Incubação dos espermatozoides com liraglutida	31
3.7.1	<u>Expressão do receptor do GLP-1 nos espermatozoides humanos</u>	31
3.7.2	<u>Motilidade e vitalidade</u>	31
3.7.3	<u>Análise estatística</u>	31
3.8	Análise de Testículo de camundongos	32
3.8.1	<u>Obtenção de testículos de camundongos</u>	32
3.8.2	<u>Expressão do receptor do GLP-1 em testículo de camundongos</u>	32
3.9	Relato de caso	32
4	RESULTADOS	33
4.1	Incubação dos espermatozoides com leptina	33
4.2	Incubação dos espermatozoides com liraglutida	39
4.3	Relato de caso	40
5	DISCUSSÃO	42
	CONCLUSÃO	48
	REFERÊNCIAS	49
	APÊNDICE A - Aprovação no Comitê de Ética.....	54
	APÊNDICE B - Declaração de Colaboração com a clínica Vida Centro de Fertilidade.....	56
	APÊNDICE C - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para publicação do relato de caso.....	57
	APÊNDICE D - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Liraglutida)	58
	APÊNDICE E - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Leptina).....	60
	APÊNDICE F - Questionário de coleta.....	62
	ANEXO A - Artigo do relato de caso do Liraglutida.....	63
	ANEXO B - Artigo dos resultados experimentais com leptina.....	66
	ANEXO C - Artigo submetido dos resultados experimentais com Liraglutida.....	67

INTRODUÇÃO

1 A INFERTILIDADE CONJUGAL

A infertilidade conjugal já é considerada uma doença, segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) e acomete 10 a 15% da população que encontra-se em idade reprodutiva. A infertilidade é definida como a incapacidade do casal de conceber, após um ano de tentativa, em que o casal manteve relações sexuais frequentes, sem uso de métodos contraceptivos (WHO, 2010).

O homem e a mulher contribuem igualmente para a infertilidade conjugal, sendo esta representada por 35% de fator feminino, 35% de fator masculino, 10% de fatores masculino e feminino associados e os 20% restantes de causa desconhecida. A infertilidade masculina pode resultar de baixa contagem de espermatozoides, baixa motilidade dos espermatozoides, uso de medicamentos e drogas, distúrbios endócrinos, exposição a poluentes ambientais, tabagismo, espermatogênese anormal, obstrução de um ducto genital, dentre outras (Brincat et al., 2015).

Dentre os casais que apresentam o quadro de infertilidade, muitos não procuram um tratamento por falta de conhecimento, por falta de acesso, por motivos religiosos e, devido ao alto custo do tratamento, por motivos financeiros. Dentre os casais que buscam o tratamento, 40% deles são beneficiados com a gestação (Neri et al., 2014). Considerando-se que a taxa de gestação natural é de 15 a 20% ao mês, a taxa de 40% de gestação utilizando-se o tratamento de reprodução assistida parece baixa a princípio, no entanto, ela representa uma média que engloba desde fatores de infertilidade com altas chances de sucesso, como por exemplo, um fator tubário (por exemplo, uma obstrução da luz da tuba uterina) ou um casal de mulheres homossexuais, até um fator de infertilidade mais complexo, como a falência ovariana precoce ou a azoospermia não obstrutiva (ausência de espermatozoides no sêmen, sem obstrução do canal deferente).

1.1 Infertilidade masculina

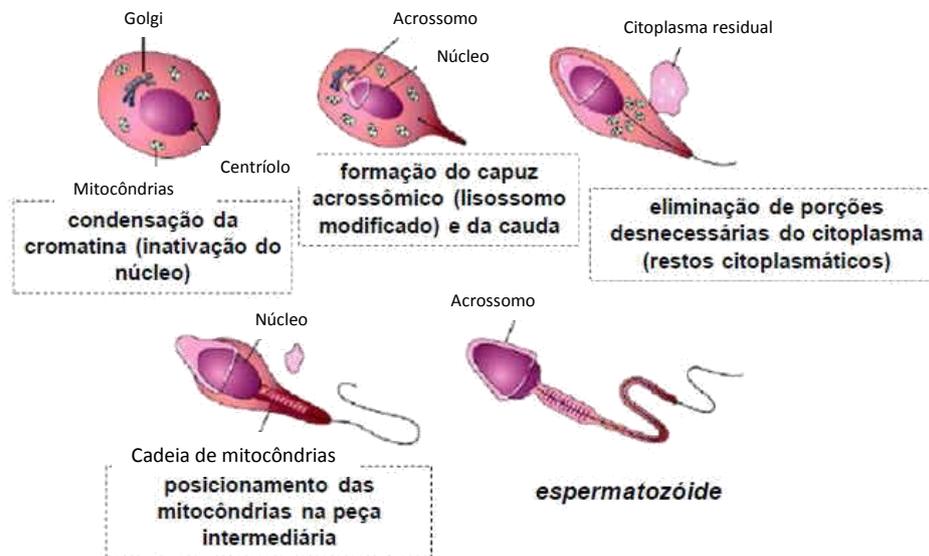
1.1.1. A espermatogênese

A produção de espermatozoides ocorre nos túbulos seminíferos, é contínua e resulta em aproximadamente 100 milhões de espermatozoides por dia. O testículo possui aproximadamente 250 túbulos seminíferos enovelados, cada um desses túbulos encontra-se em um estágio da espermatogênese, permitindo com que essa produção de espermatozoides seja ininterrupta. O ciclo da espermatogênese é completo em 75 dias, o que significa que uma alteração na produção de espermatozoides pode ser completamente revertida após 3 meses (Neto et al., 2016).

O testículo apresenta uma estrutura arquitetônica única, onde as espermatogônias se encontram na região basal do túbulo, e se diferenciam ao longo do epitélio do túbulo, até a formação de espermatozoides, que se encontram na luz dos túbulos seminíferos. As células de Leydig encontram-se no interstício, entre os túbulos seminíferos e têm por função a secreção de testosterona para a espermatogênese. As células de Sertoli fazem parte dos túbulos seminíferos, e se estendem desde a lâmina basal, até a luz do túbulo, tendo por função a nutrição e sustentação das células germinativas, participando diretamente da espermatogênese (Neto et al, 2016).

A espermatogênese termina na formação dos espermatozoides, que são células móveis e completamente diferenciadas e especializadas. Durante a espermiogênese, os espermatozoides passam por drásticas e necessárias mudanças estruturais (Figura 1), para se tornarem uma célula capaz de cumprir suas funções. Para percorrer todo o caminho até o local da fecundação, os espermatozoides precisam ser células bastante pequenas, para isso, perdem quase totalmente seu citoplasma durante a espermiogênese. O núcleo dos espermatozoides é altamente compactado para ser transportado pela menor célula do corpo humano, para isto, as histonas são trocadas por protaminas, que oferecem uma maior capacidade de enovelamento do DNA. O complexo de Golgi forma o acrossomo, rico em acrosina, que é a principal enzima necessária para digerir a zona pelúcida do oócito e alcançar a membrana do oócito para a fertilização. O flagelo dos espermatozoides é formado a partir dos centríolos. E, para oferecer energia para o batimento flagelar, as mitocôndrias formam uma rede na peça intermediária. (Helfenstein et al., 2010).

Figura 1. Fases da espermiogênese



Legenda: Fases da espermatogênese, mostrando as transformações pelas quais a espermatíde sofre para a formação dos espermatozoides. Dentre essas mudanças, temos: a alta compactação do material genético, a formação do acrossomo, o descarte quase completo do citoplasma e a formação da rede de mitocôndrias na peça intermediária do espermatozoide.

Fonte: Adaptado de: Moore e Persaud. MOORE, K.; PERSAUD, T.; TORCHIA, M. O início do desenvolvimento humano: primeira semana. In: Embriologia Clínica. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.

1.1.2 O Espermograma

A primeira ferramenta para a análise seminal é o exame de espermograma. Neste, são avaliados parâmetros espermáticos padrões e estabelecidos pela OMS. Dentre eles, temos os parâmetros macroscópicos e os parâmetros microscópicos. Os parâmetros macroscópicos (Quadro 1) incluem a avaliação do volume seminal, tempo de liquefação, pH e aspecto (coloração, viscosidade e turgidez) do sêmen (OMS, 2010).

As glândulas acessórias são as responsáveis pela constituição do plasma seminal, que é analisado dentro dos parâmetros macroscópicos. A secreção da vesícula seminal constitui 75% do volume seminal. Além disso, a vesícula seminal participa da coagulação do sêmen imediatamente após a ejaculação, para que seja formado um tampão vaginal. A próstata contribui com 20% do plasma seminal e é a glândula responsável pela alcalinização do sêmen, para que este reduza a acidez do canal vaginal e possibilite a sobrevivência do espermatozoide durante a passagem em direção ao útero. A próstata contribui também para a liquefação do sêmen, através de suas enzimas proteolíticas, desfazendo o coágulo seminal. A glândula

bulbouretral secreta um líquido que lubrifica e limpa a uretra, antes da ejaculação. Com isso, os espermatozoides constituem aproximadamente 5% do sêmen ejaculado (OMS, 2010).

Quadro 1. Parâmetros seminais macroscópicos

Parâmetros Seminais (Macroscópicos)	Valores de Referência
Volume	≥ 1,5 ml
Tempo de liquefação	≤ 60 minutos
pH	≥ 7,2

Legenda: Parâmetros macroscópicos seminais, segundo a OMS (OMS, 2010).

Fonte: O autor, 2016.

Os parâmetros microscópicos incluem a concentração, motilidade e morfologia espermáticas. De acordo com os parâmetros microscópicos, podemos classificar as amostras seminais (Quadro 2). O paciente que apresenta uma amostra com todos os parâmetros seminais normais é classificado como normospérmico (OMS, 2010).

Quadro 2. Parâmetros seminais microscópicos e classificação da amostra

Parâmetros Seminais (Microscópicos)	Valores de Referência	Classificação
Concentração	< 15 x 10 ⁶ spz/ml	<u>O</u> ligospermia
Motilidade	< 32% spz A + B	<u>A</u> stenospermia
Morfologia	< 4% morfologia normal	<u>T</u> eratospermia

Legenda: Parâmetros microscópicos seminais e a classificação da amostra, segundo a OMS (OMS, 2010).

Fonte: O autor, 2016.

O espermatozoide é o gameta masculino e o responsável pela fertilização do oócito, o gameta feminino. Para que isto ocorra, o espermatozoide possui uma função importantíssima: a entrega de seu material genético ao oócito. É fácil perceber, então, que a qualidade deste DNA é de grande importância para o desenvolvimento do embrião e a gravidez de sucesso. No entanto, existem alguns fatores que podem interferir na qualidade deste DNA. Dentre eles, o estresse oxidativo vem sendo apontado como fator relevante, nos estudos mais recentes (Gavriliouk e Aitken, 2015).

1.1.3 O estresse oxidativo

Em seu estado fisiológico, as células produzem espécies reativas de oxigênio (EROs), necessárias à maturação e capacitação espermáticas, as quais constituem o mecanismo pró-oxidante. As EROs devem constantemente ser neutralizadas por enzimas antioxidantes para manter o equilíbrio entre os mecanismos anti e pró-oxidante. Compondo o mecanismo antioxidante, temos as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase e glutathione peroxidase (GPx) (Cocuzza et al., 2007). O estresse oxidativo pode ser entendido como um desequilíbrio entre os mecanismos pró-oxidantes e antioxidantes de uma célula. O aumento do nível de EROs somado à redução do nível de enzimas antioxidantes desencadeia o estresse oxidativo (Di Santo et al., 2012).

Os espermatozoides são células especialmente mais vulneráveis ao ataque oxidativo, devido à sua exclusiva composição estrutural. Em consequência da perda da maior parte de seu citoplasma durante a espermiogênese, ocorre a redução da concentração de enzimas antioxidantes nos espermatozoides (Helfenstein et al., 2010). Além disso, sua membrana plasmática é rica em ácidos graxos poliinsaturados, tornando-a mais suscetível à peroxidação lipídica. Esses fatores determinam maior propensão dos espermatozoides à ação deletéria das EROs (Aitken et al., 2010).

Ao sofrer um ataque oxidativo, seu material genético pode ter um grande dano, uma vez que encontra-se altamente compactado. Com isso, os efeitos deletérios do estresse oxidativo podem acarretar diversas alterações estruturais dos espermatozoides, tais como a fragmentação protéica, a peroxidação lipídica e a fragmentação da membrana e do DNA espermático (Helfenstein et al., 2010). O estresse oxidativo já é considerado uma causa de infertilidade masculina, visto que a elevada presença das EROs causa danos à motilidade espermática e à integridade do DNA espermático (Sieme et al., 2015).

1.1.4 Fragmentação do DNA espermático (fDNA)

Além dos parâmetros padrões avaliados no espermograma, outros testes vêm se mostrando preditores da infertilidade masculina, como por exemplo, testes de fDNA espermático, testes que avaliam o estresse oxidativo, testes de anticorpos antiespermatozoides,

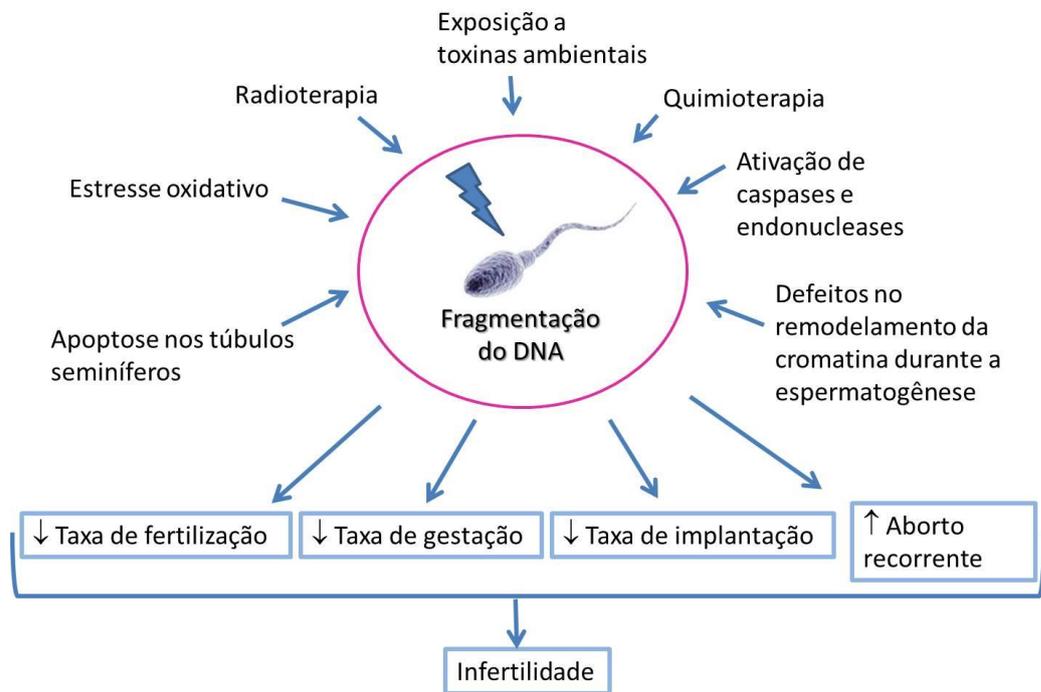
teste de reação acrossômica. Podemos destacar o teste de avaliação da fragmentação do DNA espermático, que consegue detectar 8% dos homens inférteis que possuem um espermograma normal (Lewis et al., 2013).

Existem alguns testes disponíveis para a avaliação da taxa de fDNA, dentre eles, temos o SCSA (Sperm Chromatin Structure Assay), o TUNEL (TdT-mediated-dUTP nick end labeling), o ensaio COMETA (em gel de eletroforese) e o SCD (Sperm Chromatin Dispersion). O teste SCSA é considerado o padrão-ouro para avaliação da fragmentação do DNA (Lewis et al., 2013). No entanto, o SCSA não se encaixa na realidade das clínicas de reprodução assistida, pois necessita de maior tempo de experimentação e tem como metodologia a microscopia de fluorescência. Já o SCD dispõe de relativo rápido tempo de preparo, já foi validado como um teste capaz de obter os resultados do teste padrão-ouro e já é utilizado nas clínicas para avaliação, complementando o resultado do espermograma. O método do SCD consiste em uma desnaturação das proteínas que envolvem o DNA dos espermatozoides, descompactando a cromatina (Feijó e Esteves, 2014).

Alguns centros de reprodução assistida, que não realizam ainda o teste de fDNA em seus laboratórios, enviam as amostras para laboratórios de São Paulo. Essas amostras são enviadas congeladas, por orientação dos próprios laboratórios diagnósticos de São Paulo.

A fDNA espermático pode ser causada por diversos fatores: apoptose nos túbulos seminíferos, defeitos no remodelamento da cromatina durante a espermiogênese, estresse oxidativo, ativação de caspases e endonucleases, quimioterapia e radioterapia, exposição a toxinas ambientais. O aumento nas taxas de fragmentação do DNA espermático está relacionado à alteração da morfologia embrionária, à redução das taxas de implantação e ao aumento do aborto recorrente (Figura 2) (Sakkas e Alvarez, 2010; Zhao et al., 2014).

Figura 2. Fragmentação do DNA espermático



Legenda: Fatores que causam a fragmentação do DNA espermático e o resultado do aumento das taxas de fragmentação do DNA.

Fonte: Adaptado de Sakkas e Alvarez, 2010.

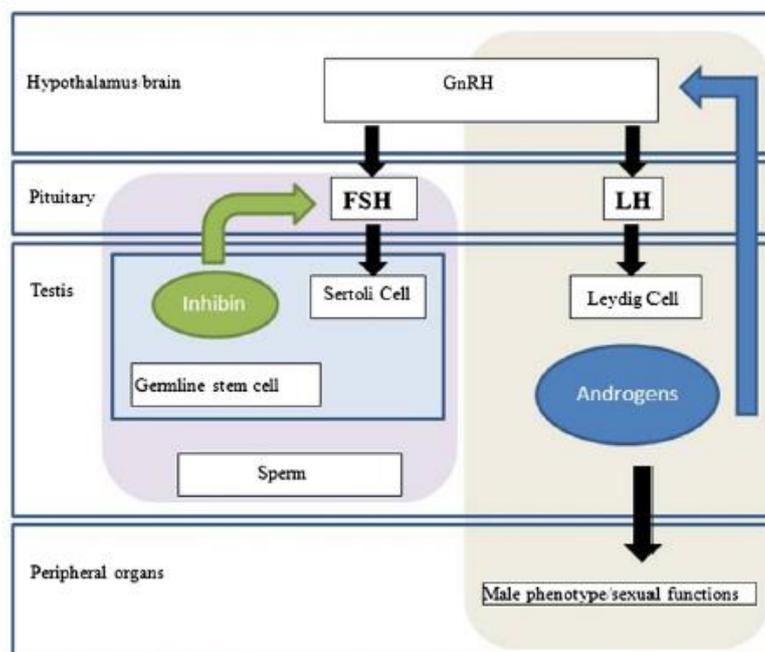
1.2 Hormônios que regulam a fertilidade

1.2.1 Regulação hormonal clássica

O testículo tem como funções essenciais a espermatogênese e a secreção de hormônios sexuais, ambas reguladas através do eixo hipotalâmico-hipofisário. O hipotálamo secreta o GnRH (hormônio liberador de gonadotropinas), que estimula a hipófise na secreção de FSH (hormônio folículo estimulante) e LH (hormônio luteinizante). O FSH estimula as células de Sertoli, a qual tem por função criar um ambiente favorável para a proliferação e maturação das células da linhagem germinativa, além de produzirem inibina B. O LH estimula as células de Leydig a produzirem testosterona, que por sua vez, é importante para a espermatogênese, pois participa do processo de diferenciação da espermátide. Ambas, inibina B e testosterona

regulam a secreção dos hormônios GnRH, FSH e LH, através de feedback negativo. Essa regulação endócrina é necessária para o funcionamento adequado da espermatogênese. Qualquer alteração na regulação hormonal do eixo pode causar redução ou ausência da produção espermática, podendo levar à subfertilidade ou até mesmo à infertilidade (Dimitriadis et al., 2015).

Figura 3. Regulação hormonal da espermatogênese.



Legenda: Adaptado de: Regulação hormonal do eixo hipotálamo-hipofisário-gonadal.
Fonte: Schlatt e Ehmcke, Seminars in Cell & Developmental Biology, 2014

1.2.2 Leptina

A leptina é um hormônio peptídico produzido principalmente pelo tecido adiposo. Suas funções mais amplamente conhecidas estão relacionadas à obesidade, levando à inibição do apetite, da ingestão alimentar e à estimulação do gasto energético. No entanto, já foi

mostrada sua atuação nos diversos sistemas do organismo, dentre eles, o sistema reprodutor (Li et al., 2009).

A presença da leptina e de seu receptor em espermatozoides já foi descrita (Aquila et al., 2005; Jope et al., 2003; Li et al., 2009), no entanto, seu papel na espermatogênese e no espermatozoide ainda não está completamente esclarecido. Trabalhos da literatura mostram resultados conflitantes sobre o papel da leptina no número e qualidade dos espermatozoides. Lampiao e Du Plessis encontraram um aumento da motilidade total e progressiva, da reação acrossômica, assim como da produção de NO, após incubação *in vitro* de espermatozoides com leptina (Lampiao e Du Plessis, 2008). Em contraste, Li e colaboradores não observaram efeitos significativos da leptina sobre a motilidade espermática, a porcentagem de espermatozoides capacitados e que sofreram reação acrossômica, após incubação *in vitro* com leptina (Li et al., 2009).

Em outras espécies também foram realizados alguns experimentos com leptina. Em porcos, a incubação *in vitro* de espermatozoides com leptina levou ao aumento da reação acrossômica e produção de óxido nítrico (Aquila et al., 2013). Em contraste, o trabalho de Haron et al (2010) não realizou incubação *in vitro* da leptina com espermatozoides, e sim, fez injeções intraperitoneais de leptina em ratos e observou uma redução da contagem espermática, aumento da porcentagem de espermatozoides com morfologia anormal, redução do diâmetro dos túbulos seminíferos e da altura do epitélio seminífero (Haron et al., 2010).

Já foi sugerido que a leptina tenha efeitos sobre o estresse oxidativo (Solinas et al., 2010; Yamagishi et al, 2001; Zheng et al., 2010), agindo sobre a peroxidação lipídica (Solinas et al., 2010) e a atividade de enzimas antioxidantes (Yamagishi et al., 2001; Zheng et al., 2010). Nestes trabalhos o efeito da leptina sobre o estresse oxidativo foi testado em células endoteliais e cardiomiócitos. Nenhum dos trabalhos avaliou o efeito da leptina sobre o estresse oxidativo em espermatozoides. Além disso, até o momento, não há estudos investigando o papel da leptina no congelamento de espermatozoides.

1.2.3 GLP-1

O liraglutida é um agonista do receptor do *hormônio peptídeo similar ao glucagon, glucagon-like peptide I* (GLP-Ir) e é comumente recomendado para obesidade e tratamento do diabetes tipo 2 (Marathe et al., 2013). Efeitos adversos relacionados ao tratamento com

liraglutida incluem pancreatite (Knezevich et al., 2012) e poliartrite (Ambrosio et al., 2014). Os hormônios *gut* e hormônios do tecido adiposo têm sido citados como potenciais reguladores da função reprodutiva (Comninus et al., 2014).

A primeira evidência do papel do GLP-1 no sistema reprodutor foi em um estudo com camundongos *knock-out* para o receptor de GLP-1, sendo observado um atraso da puberdade em fêmeas e redução do peso das gônadas de machos, mesmo na presença de níveis de hormônios esteróides normais em ambos os sexos (Mac Lusky et al., 2000). Em homens, a infusão de GLP-1 reduziu a frequência de pulsos de secreção de testosterona, sugerindo um efeito inibitório da secreção de testosterona, mesmo em níveis inalterados de LH (Jeibmann et al., 2005).

Recentemente foram comunicados ao *Food and Drugs Administration* (FDA) dois casos de diminuição da produção de espermatozoides com o uso do liraglutida (FDA communication). Estudos envolvendo a interação entre o GLP-I e o sistema reprodutor ainda são escassos. Nosso grupo publicou um relato de caso de paciente azoospermico, em uso de liraglutida (Fontoura et al., 2014).

1.3 Criopreservação de espermatozoides

A criopreservação de gametas e embriões tem uma grande importância na área da reprodução assistida, para preservar a fertilidade e propiciar a possibilidade de armazenar diferentes células envolvidas no processo de fertilidade. Levando-se em conta os espermatozoides, a criopreservação tem diversas aplicações, tais como o congelamento seminal prévio às cirurgias de prostatectomia, vasectomia, aos tratamentos de quimioterapia, radioterapia, e para o banco de sêmen de doadores (Petyim et al., 2014).

O espermatozoide humano permite o uso de diversos protocolos de congelamento, uma vez que apresenta uma boa taxa de sobrevivência ao descongelamento, devido ao seu pequeno volume, ampla superfície e pequena quantidade intracelular de água. As taxas de sobrevivência variam entre 25 a 75%, com uma média de 50%. Essa taxa varia de acordo com tipos de crioprotetores, protocolos de congelamento e com a qualidade seminal (Sieme et al., 2016).

No entanto, o ciclo de congelamento e descongelamento leva à formação de cristais de gelo intracelulares que ocasionam o rompimento de membranas e organelas celulares (Petyim

et al., 2014); modifica a estrutura e integridade das membranas plasmáticas (Sieme et al., 2015); altera o potencial de membrana mitocondrial e libera EROs (Yeste et al., 2015). Além disso, a criopreservação reduz a atividade antioxidante do espermatozoide, tornando-o ainda mais susceptível à ação das EROs (Di Santo et al., 2012), podendo inviabilizar a função da célula e, até mesmo, levar à apoptose (Petyim et al., 2014).

Com o intuito de minimizar esses efeitos deletérios, alguns trabalhos vêm testando a ação de antioxidantes na criopreservação seminal (Mata-Campuzano et al., 2015; Zhang et al., 2015). Zhang et al observou efeito crioprotetor da l-carnitina, levando a uma significativa melhora dos parâmetros espermáticos pós congelamento, incluindo os níveis de fDNA (Zhang et al., 2015). Mata-Campuzano et al também observou redução da peroxidação lipídica e da fDNA, após incubação de espermatozoides com antioxidantes durante a criopreservação (Mata-Campuzano et al., 2015).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O objetivo deste estudo foi investigar a função da leptina e liraglutida sobre a função espermática.

2.2 Objetivos específicos

- Os testes de fragmentação do DNA espermático no Rio de Janeiro eram comumente realizados com amostras congeladas enviadas para um laboratório em São Paulo. Surgiu a hipótese de que o congelamento poderia interferir nos resultados do teste de fragmentação. Para testar essa hipótese, avaliamos os efeitos do ciclo de congelamento e descongelamento sobre a fragmentação do DNA de espermatozoides humanos.
- Sabe-se que a leptina e seu receptor estão presentes nos espermatozoides e tendo em vista seu papel no estresse oxidativo, avaliamos a hipótese da leptina ter papel na criopreservação. Avaliamos se a capacitação espermática e a adição de leptina ao meio de cultivo previamente ao congelamento podem interferir na qualidade espermática após o descongelamento dos espermatozoides.
- Com o aparecimento de um caso de azoospermia na Clínica Vida Centro de Fertilidade devido ao uso de liraglutida, foi publicado um relato de caso.
- A partir do achado da influência do liraglutida sobre a fertilidade masculina, foi avaliada a presença de receptores do GLP-1 em espermatozoides humanos e testículos de camundongos, e foi avaliada a hipótese do liraglutida ter papel sobre a função espermática.

3 METODOLOGIA

3.1 Seleção de pacientes

Participaram deste estudo 114 indivíduos normospérmicos provenientes do Laboratório de Reprodução Assistida da clínica Vida Centro de Fertilidade, com até 45 anos de idade, que preencheram os seguintes critérios de inclusão: não portar infecções do trato urogenital, não apresentar varicocele ou hidrocele, não ser portador de outras doenças, tais como diabetes mellitus, obesidade, desnutrição, tabagismo e alcoolismo. As amostras leucospérmicas também foram excluídas do estudo, uma vez que os leucócitos produzem uma grande quantidade de EROs, podendo alterar os experimentos de estresse oxidativo. Para realização deste estudo, foi firmado um acordo com a Clínica Vida Centro de Fertilidade. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Pedro Ernesto (CEP/HUPE 432.202) e tem o consentimento escrito dos pacientes.

3.2 Coleta seminal

Para a coleta seminal, os pacientes foram orientados a não ingerir bebidas alcoólicas no dia anterior. A coleta seminal foi feita através de masturbação, respeitando-se o período de abstinência ejaculatória de 2 a 5 dias. As amostras foram coletadas em frascos estéreis previamente identificados e permaneceram a 37°C por 30 minutos até liquefação.

3.3 Análise seminal

A análise macroscópica incluiu a avaliação do volume, viscosidade, cor, turgidez, tempo de liquefação e pH da amostra seminal; enquanto que a análise microscópica incluiu a avaliação dos parâmetros de concentração, motilidade, vitalidade e morfologia espermáticas. A análise microscópica foi realizada somente após a liquefação da amostra. A análise seminal

foi realizada com o objetivo de classificar as amostras e, a partir desta classificação, foram incluídos apenas os pacientes normospérmicos e excluídos os pacientes das demais classificações.

- **Concentração:** A avaliação da concentração dos espermatozoides foi realizada utilizando-se a câmara de *Neubauer*. O resultado foi dado em milhões por ml (OMS, 2010).
- **Motilidade:** A determinação da motilidade espermática foi realizada utilizando-se a câmara de *Makler*. O resultado foi dado em porcentagem para cada uma das classificações: grau A (progressiva rápida), grau B (progressiva lenta), grau C (não progressiva) e grau D (ausência de motilidade) (OMS, 2010).
- **Vitalidade:** A avaliação da vitalidade dos espermatozoides foi realizada a partir da adição de eosina a 0,5% à amostra. O resultado foi dado em porcentagem para as classificações de espermatozoides vivos e mortos, posteriormente à contagem de 200 espermatozoides (OMS, 2010).
- **Morfologia:** Foi utilizado o kit *Spermac* para coloração das lâminas contendo esfregaço seminal. O resultado foi dado em porcentagem para cada uma das classificações: normais, alteração na cabeça, na peça intermediária, na cauda e alterações associadas, posteriormente à contagem de 200 espermatozoides (OMS, 2010).
- **Mensuração de leucócitos:** Foi utilizado o Panótico Rápido para a coloração das lâminas contendo esfregaço seminal. A concentração de leucócitos foi considerada normal quando menor que 1×10^6 milhões por ml. A partir de 1×10^6 milhões por ml, a amostra foi considerada leucospérmica e excluída deste estudo (OMS, 2010).

3.4 Classificação dos pacientes segundo os critérios da OMS

Os pacientes foram classificados como normospérmicos quando apresentaram todos os parâmetros seminais normais. Os pacientes que apresentaram as demais classificações foram excluídos do estudo.

3.5 Capacitação espermática

Para a realização da capacitação espermática, os espermatozoides foram centrifugados a 1050 rpm sobre dois gradientes descontínuos de densidade (90% e 45%) por 20 minutos (SpermGrad, Vitrolfe). Em seguida, foi feita uma lavagem a 1050 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado, foi acrescentado gentilmente ao pellet, 1 ml de meio de cultivo suplementado (Human Tubal Fluid – HTF, Irvine Scientific), e o tubo permaneceu a 37 °C com inclinação de 45° por 1 hora. A fração móvel de espermatozoides foi obtida através da técnica de *swim-up*, ao remover o sobrenadante. O recuperado contendo espermatozoides móveis foi dividido em alíquotas para incubação com leptina e com liraglutida.

3.6 Incubação dos espermatozoides com leptina

Foi feita a incubação de alíquotas do recuperado capacitado com 10 ng de leptina a 37°C e 6% de CO₂ *overnight*, previamente ao congelamento dos espermatozoides.

3.6.1 Expressão da leptina e de seu receptor nos espermatozoides

A fração capacitada de espermatozoides foi lavada e ressuspensa em tampão de lise. A mesma quantidade de proteínas (80 µg) das amostras foi utilizada. As amostras passaram por banho maria a 95°C por 5 minutos, foram separadas por um gel de poliacrilamida de eletroforese a 12% e transferidas para uma membrana de nitrocelulose. A diluição dos anticorpos primários foi de 1:1000 do anticorpo para leptina e de 1:1000 do anticorpo para ObR. A ligação do anticorpo secundário foi revelada com ECL.

3.6.2 Padronização da dosagem de leptina

Foi realizada a padronização da concentração de leptina a ser utilizada na incubação *overnight* dos espermatozoides. Foram testadas as concentrações de 0, 10, 100 e 1000 ng.

3.6.3 Validação da técnica de fDNA espermático

Para a validação da técnica de fDNA foram realizadas análises com as mesmas amostras que eram enviadas ao laboratório diagnóstico RDO, considerado padrão ouro. Foram calculados os valores de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo (VPP) e valor preditivo negativo (VPN) durante a validação.

3.6.4 fDNA espermático

Para avaliação da fDNA espermático foi utilizado o kit *Hallosperm* (Halotech DNA, S.L.). Os espermatozoides foram imersos em microgel de agarose em lâminas pré-tratadas. Foram adicionadas: a solução desnaturante, para denaturar as proteínas nucleares; a solução de lise para romper a membrana dos espermatozoides e liberar o conteúdo genético. O DNA não íntegro foi dispensado durante lavagem com água destilada. O material foi fixado com álcool e a coloração foi realizada com *Diff-Quick*. Os espermatozoides foram observados em aumento de 100X com óleo de imersão e classificados como normais, fragmentados e degenerados. Foram analisados 300 espermatozoides por amostra. O valor de corte do teste é de 30%. Ou seja, amostras com a fDNA acima deste valor, apresentam-se alteradas. Este teste foi utilizado para comparar amostras a fresco, congeladas, capacitadas e amostras com adição de leptina ao meio de cultivo.

3.6.5 Mecanismos pró-oxidantes em espermatozoides

A avaliação dos mecanismos pró-oxidantes foi realizada nas amostras com e sem adição de leptina.

3.6.5.1 Peroxidação lipídica

A determinação da peroxidação lipídica em espermatozoides foi avaliada através da mensuração de substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). A oxidação de ácidos graxos da membrana forma um subproduto, o malondialdeído (MDA), que reage ao TBARS. Esta reação forma um produto róseo que foi medido espectrofotometricamente, no comprimento de onda de 532 nm (Draper e Hadley, 1990).

3.6.5.2 Sulfidrilção de proteínas

A oxidação de proteínas baseia-se no princípio da reação do DTNB com grupamentos sulfidril (SH). O conteúdo SH foi medido espectrofotometricamente, no comprimento de onda de 412 nm (Ellman, 1959).

3.6.6 Mecanismos antioxidantes em espermatozoides

A avaliação dos mecanismos antioxidantes foi realizada nas amostras com e sem adição de leptina.

3.6.6.1 SOD

A adrenalina sofre oxidação pela ação do ânion superóxido, que por sua vez, pode ser inibido pela atividade da enzima SOD. A oxidação da adrenalina pelo ânion superóxido forma o produto adrenocromo.

A atividade enzimática da SOD (produto adenocromo) foi medida espectrofotometricamente, no comprimento de onda de 480 nm. Foram utilizados os volumes de 20, 40 e 60 µl de cada amostra em três cubetas diferentes, que foram lidas uma de cada vez, adicionando a elas os seguintes reagentes: 1940 µl de tampão glicina (0,75 g em 200 ml de água destilada, pH = 10,2), 20 µl de catalase (0,0024 g/ml de água destilada) e, por último, 40 µl de norepinefrina (95 mg em 5ml de água destilada + 15 µl/ml de HCl fumegante). As leituras foram feitas em intervalos de 10 segundos, durante 3 minutos para cada cubeta (Bannister e Calabrese, 1987).

Os valores obtidos na leitura foram passados para uma planilha de *Excel*. Os resultados obtidos foram apresentados em U de SOD/mg de proteína.

3.6.6.2 Catalase

A catalase promove a degradação do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em oxigênio e água. A atividade da enzima catalase foi medida pela quantificação do H_2O_2 espectrofotometricamente, no comprimento de onda de 240 nm. Em cada cubeta foi adicionado 1 ml de tampão fosfato (PBS) com peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (25 ml de PBS para 40 µl de H_2O_2) e 200 µl de cada amostra. As leituras foram feitas em intervalos de 30 segundos, durante 1 minuto (Aebi, 1984).

Os valores obtidos foram passados para uma planilha de *Excel*. Os resultados obtidos foram apresentados em U de catalase/mg de proteína.

3.6.6.3 GPx

A GPx catalisa a redução do H₂O₂ e hidroperóxidos orgânicos em água e álcool, utilizando a glutathiona como doadora de elétrons. A atividade da enzima GPx foi determinada através da taxa de decaimento de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido (NADPH), por espectrofotometria, no comprimento de onda de 340 nm (Flohe e Gunzler, 1984).

Os valores obtidos foram passados para uma planilha de *Excel*. Os resultados obtidos foram apresentados em U de GPx/mg de proteína.

3.6.7 Motilidade e vitalidade

As taxas de motilidade e vitalidade foram determinadas antes e após a incubação *overnight* com leptina, em amostras a fresco.

3.6.8 Análise estatística

Foi utilizado o programa estatístico *GraphPad Prism 6.0* para análise dos resultados. Os dados foram apresentados como média \pm erro padrão da média (E.P.M.). A normalidade da amostra foi testada através do teste *D'Agostino-Pearson*. Para análise estatística dos resultados foi utilizado o teste *t* pareado para comparar dois grupos antes e após o congelamento, a capacitação espermática e a adição de leptina ao meio de cultivo. Foi utilizado o teste ANOVA de medidas repetidas para comparar os grupos antes e após incubação dos espermatozoides com diferentes concentrações de leptina. Foi utilizado o pós-teste de *Holm-Sidak* e a significância estatística foi considerada quando $p \leq 0,05$.

3.7 Incubação dos espermatozoides com liraglutida

Foi feita a incubação de alíquotas do recuperado capacitado com 10 nM, 100 nM e 1000 nM de liraglutida *overnight*, a 37°C e 6% de CO₂.

3.7.1 Expressão do receptor do GLP-1 nos espermatozoides

A fração capacitada de espermatozoides foi lavada e ressuspensa em tampão de lise. A mesma quantidade de proteínas (80µg) das amostras foi utilizada. As amostras passaram por banho maria a 95°C por 5 minutos, foram separadas por um gel de poliacrilamida de eletroforese a 12% e transferidas para uma membrana de nitrocelulose. A diluição do anticorpo primário foi de 1:1000 do anticorpo para receptor de GLP-1. A ligação do anticorpo secundário foi revelada com ECL.

3.7.2 Motilidade e vitalidade

As taxas de motilidade e vitalidade foram determinadas antes e após a incubação *overnight* com liraglutida, em amostras a fresco.

3.7.3 Análise estatística

Foi utilizado o programa estatístico *GraphPad Prism* 6.0 para análise dos resultados. Os dados foram apresentados como média ± E.P.M. A normalidade da amostra foi testada através do teste *D'Agostino-Pearson*. Para análise estatística dos resultados foi utilizado o teste ANOVA de medidas repetidas para comparar os grupos antes e após incubação dos espermatozoides com diferentes concentrações do liraglutida. Foi utilizado o pós-teste Holm Sidak e a significância estatística foi considerada quando $p \leq 0.05$.

3.8 Análise de testículos de camundongos

3.8.1 Obtenção de testículos de camundongos

Foram coletados testículos direitos de camundongos C57BL/6 para análise da expressão protéica do receptor de GLP-1. Essas amostras foram processadas em Potter para obtenção de homogenato.

3.8.2 Expressão do receptor do GLP-1 no testículo de camundongos

As proteínas do testículo foram extraídas e homogeneizadas com tampão de lise. A mesma quantidade de proteínas (80µg) das amostras foi utilizada. As amostras passaram por banho maria a 95°C por 5 minutos, foram separadas por um gel de poliacrilamida de eletroforese a 12% e transferidas para uma membrana de nitrocelulose. A diluição do anticorpo primário foi de 1:1000 do anticorpo para receptor de GLP-1. A ligação do anticorpo secundário foi revelada com ECL.

3.9 Relato de caso

O caso do paciente da clínica Vida Centro de Fertilidade, que estava fazendo uso de liraglutida e teve o acompanhamento da redução de sua produção espermática foi publicado na revista *Reproductive Biomedicine Online* e encontra-se disponível em anexo (Anexo A). O consentimento escrito do paciente foi obtido e também encontra-se em anexo (Apêndice C).

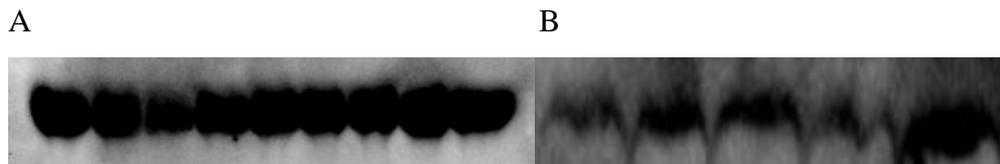
4 RESULTADOS

4.1 Incubação dos espermatozoides com leptina

4.1.1 Expressão de leptina e seu receptor nos espermatozoides

Através da técnica de western blotting confirmamos a presença da leptina (Figura 4A) e de seu receptor ObR-b (Figura 4B) em espermatozoides isolados de pacientes normospérmicos, confirmando dados da literatura¹⁰.

Figura 4. Expressão de leptina e seu receptor

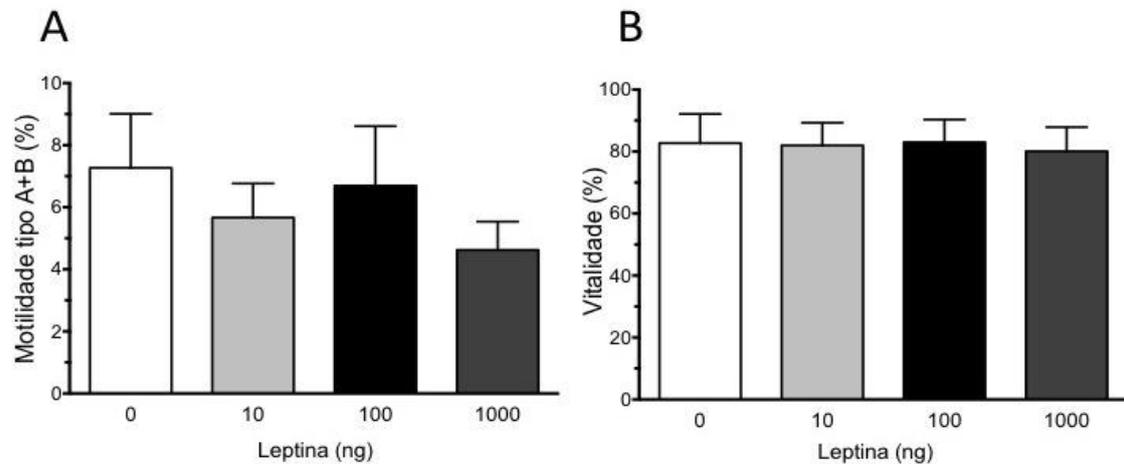


Legenda: Expressão protéica de leptina (4A) (n=9) e de seu receptor ObR-b (4B) (n=5) em espermatozoides isolados de pacientes normospérmicos.

4.1.2 Padronização da dosagem de leptina

As taxas de motilidade ($p=0,6$) (Figura 5A) e de vitalidade ($p=0,9$) (Figura 5B) não diferiram entre as concentrações de leptina (10, 100 e 1000 ng). A partir desses resultados, selecionamos a concentração de 10 ng para os experimentos posteriores, uma vez que esta é a dose utilizada em trabalhos com espermatozoides humanos^{12,13} e que doses superiores mostraram não ter efeitos.

Figura 5. Motilidade e vitalidade espermática em diferentes concentrações de leptina

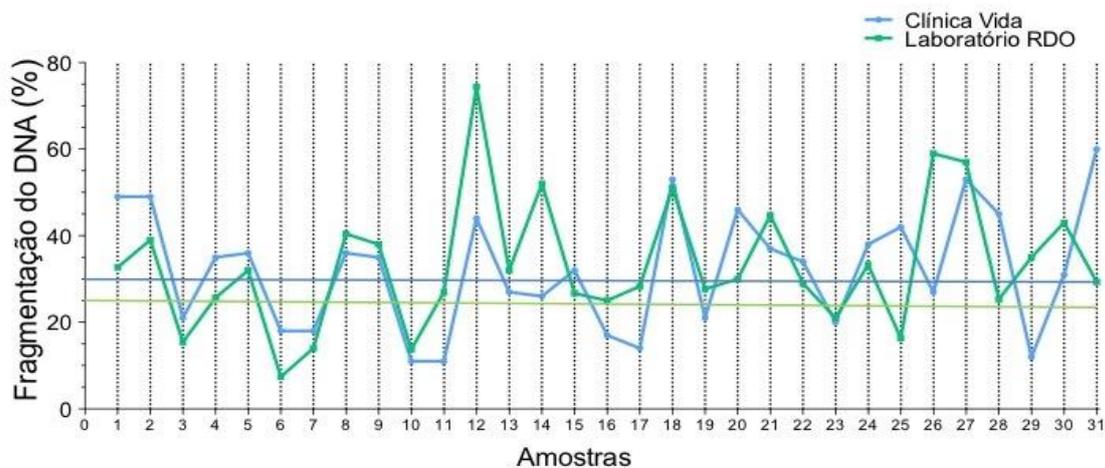


Legenda: Porcentagem de motilidade progressiva (5A) e de vitalidade (5B) espermáticas em diferentes concentrações de leptina. Valores representados como média \pm erro padrão da média, n=14.

4.1.3 Validação da técnica de fDNA espermático

O teste de fDNA espermático foi validado (Figura 6) posteriormente às mensurações de sensibilidade (71,4%), especificidade (90%), valor preditivo positivo (93,8%) e valor preditivo negativo (60%).

Figura 6. Validação da técnica de fragmentação do DNA no laboratório

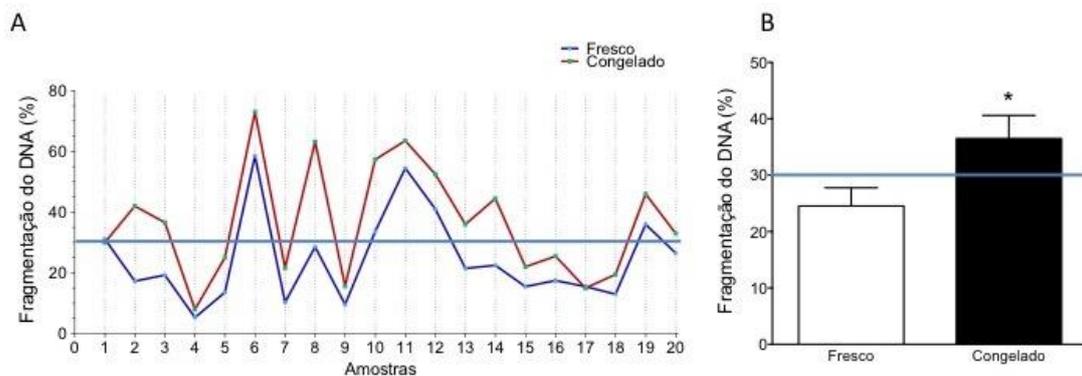


Legenda: Porcentagem de fragmentação do DNA espermático de cada amostra avaliada (n=31). As leituras apresentadas em verde correspondem ao Laboratório diagnóstico RDO (considerado padrão ouro), que utiliza um teste cujo valor de corte é de 25%. As leituras apresentadas em azul correspondem às contagens realizadas na clínica Vida, que utilizou o teste Halosperm, cujo valor de corte é de 30%. As linhas horizontais correspondem aos respectivos valores de corte de cada teste.

4.1.4 fDNA espermático

Houve um aumento ($p < 0,0001$) da taxa de fDNA espermático após o congelamento ($36,5 \pm 4,1$), comparado à análise realizada com a mesma amostra a fresco ($24,5 \pm 3,2$). Este aumento ocorreu de tal forma que 21,6% dos pacientes que apresentaram um diagnóstico alterado (acima de 30% fDNA) tinham, na verdade, amostras normais (abaixo de 30%) na avaliação a fresco. Esse resultado sugere que a análise realizada com amostras a fresco é mais fidedigna (Figura 7).

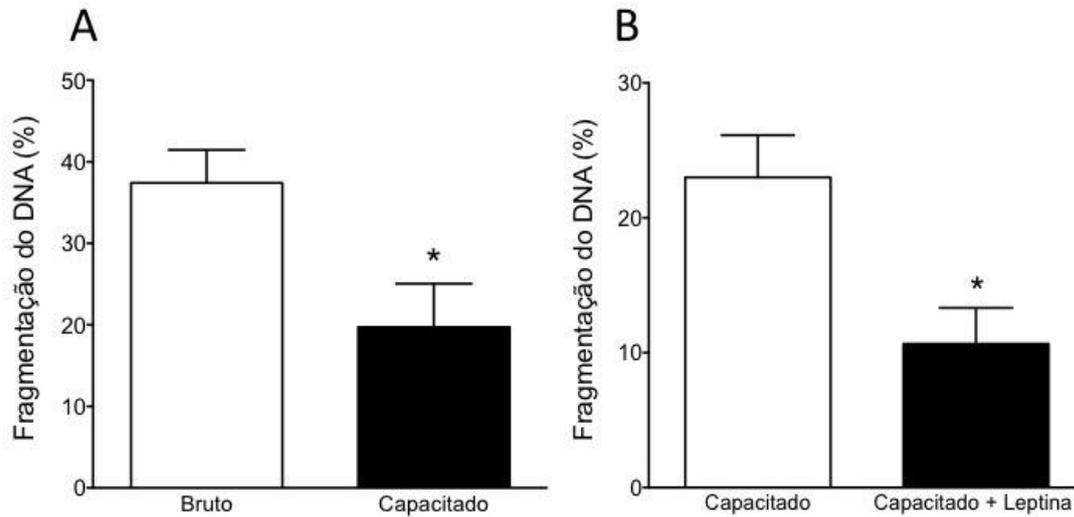
Figura 7. Taxas de fragmentação do DNA espermático antes e após congelamento



Legenda: Porcentagem de fragmentação do DNA espermático em amostras analisadas a fresco e após o congelamento ($n=20$). As leituras apresentadas em azul correspondem às amostras a fresco e as leituras apresentadas em vermelho às amostras congeladas. As linhas horizontais correspondem ao valor de corte do teste (30%). Os gráficos estão sendo representados através de pontos referentes às leituras (7A) e em barras (7B) constituindo média \pm erro padrão da média.

Houve uma redução significativa ($p=0,0144$) da taxa de fDNA em amostras capacitadas (Figura 8A) previamente ao congelamento ($19,7 \pm 5,3$), quando comparada às amostras de semen bruto congeladas ($37,4 \pm 4,0$). A adição de leptina previamente ao congelamento seminal (Figura 8B) também reduziu ($p < 0,0001$) a fDNA ($10,7 \pm 2,6$), comparando-se às amostras sem adição de leptina ($23,0 \pm 3,1$). Esses resultados sugerem que, assim como outros antioxidantes^{10,11}, a leptina também demonstrou um efeito crioprotetor.

Figura 8. Taxas de fragmentação do DNA em sêmen bruto, capacitado e capacitado com leptina

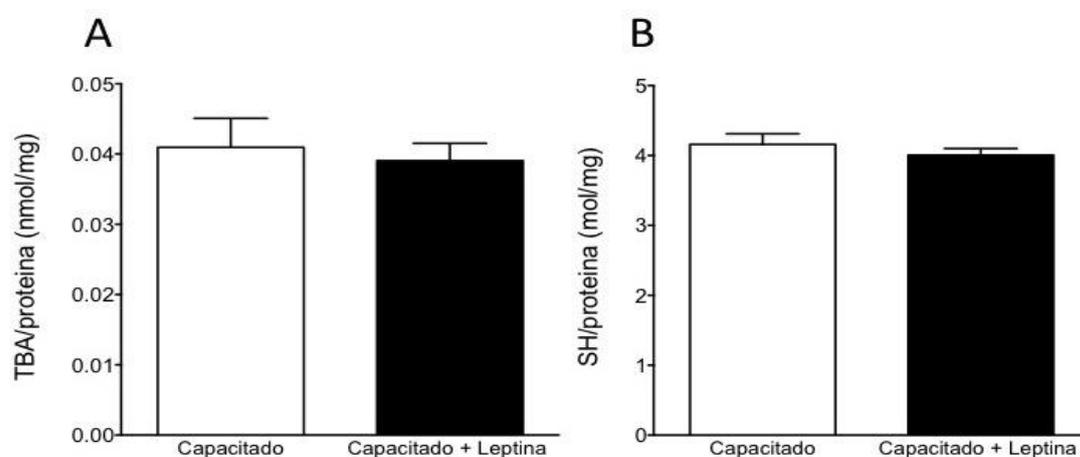


Legenda: Porcentagem de fragmentação do DNA espermático em amostras com e sem capacitação prévia ao congelamento (8A) (n=13) e amostras capacitadas com ou sem adição de leptina prévia ao congelamento (8B) (n=11). Os resultados dos gráficos estão sendo representados como média \pm erro padrão da média.

4.1.5 Mecanismos pró-oxidantes em espermatozoides

A leptina não teve efeito na peroxidação lipídica ($p=0,6$) (Figura 9A) e na sulfidrilção de proteínas ($p=0,3$) (Figura 9B).

Figura 9. Dano oxidativo em amostras capacitadas com e sem leptina

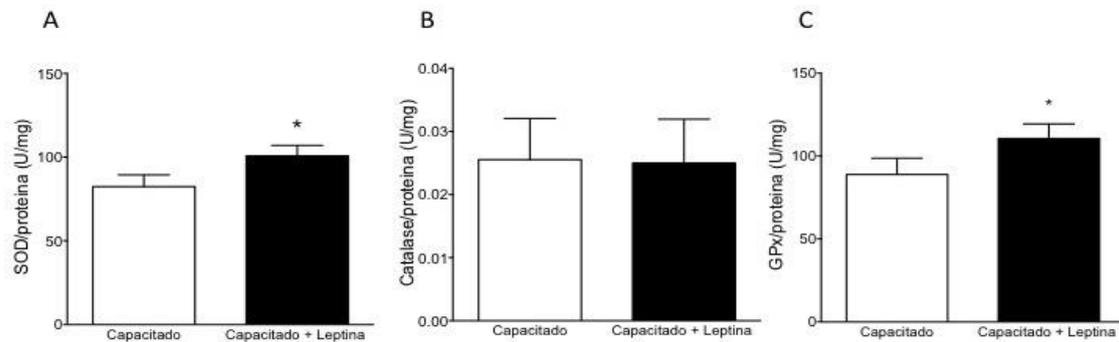


Legenda: Dano oxidativo mensurado através da peroxidação lipídica (9A) (n=11) e da oxidação de proteínas (9B) (n=11) em espermatozoides. Os resultados dos gráficos estão sendo representados como média \pm erro padrão da média.

4.1.6 Atividade das enzimas antioxidantes em espermatozoides

Houve um aumento da atividade das enzimas antioxidantes SOD (Figura 10A) e GPx (Figura 10B) quando comparou-se amostras com e sem adição de leptina (SOD=100,8 \pm 6,2 vs 82,4 \pm 6,9; p=0,001; GPx=110,7 \pm 8,7 vs 88,8 \pm 9,8; p=0,02; respectivamente). No entanto, a enzima antioxidante catalase não diferiu entre os grupos (p=0,9), (Figura 10C). O aumento na atividade dessas enzimas comprova o papel antioxidante da leptina, confirmando a hipótese inicial de seu papel crioprotetor.

Figura 10. Atividade das enzimas antioxidantes

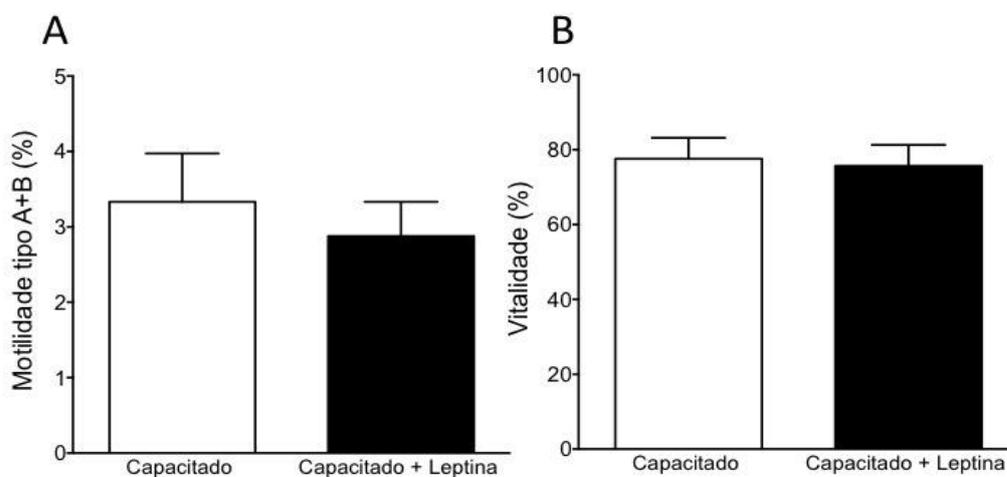


Legenda: Atividade antioxidante mensurada através das enzimas SOD (10A), catalase (10B) e GPx (10C) em espermatozoides. Os resultados dos gráficos estão sendo representados como média \pm erro padrão da média; n=11.

4.1.7 Taxa de motilidade e vitalidade espermáticas

As taxas de motilidade progressiva ($p=0,2$) (Figura 11A) e vitalidade ($p=0,6$) (Figura 11B) não diferiram após incubação de leptina *overnight*. Nossos resultados corroboram o trabalho de Li e colaboradores (Li et al., 2009) e contrastam com os achados de Lampiao e Du Plessis (Lampiao e Du Plessis, 2008).

Figura 11. Motilidade e vitalidade espermática em diferentes concentrações de leptina



Legenda: Porcentagem de motilidade progressiva (11A) e vitalidade (11B) espermáticas em amostras capacitadas com e sem leptina. Os resultados estão sendo representados como média \pm erro padrão da média; n=20.

4.2 Incubação dos espermatozoides com liraglutida

4.2.1 Expressão do receptor do GLP-1 em espermatozoides

Através da técnica de western blotting foi observada a presença do receptor de GLP-1 em pool de espermatozoides de pacientes normospérmicos (Figura 12).

Figura 12. Expressão do receptor de GLP-1 em espermatozoides

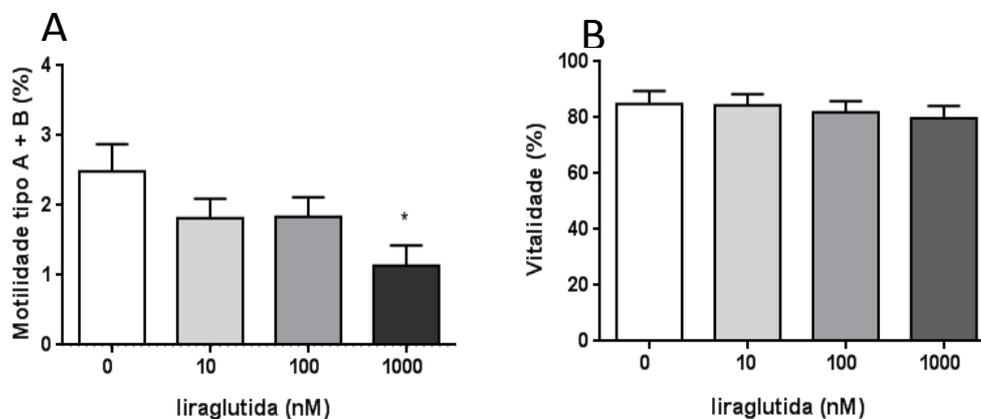


Legenda: Expressão protéica de GLP-1 em pool de espermatozoides de 9 indivíduos normospérmicos (n=9)

4.2.2 Motilidade e vitalidade

Após incubação *overnight* com liraglutida, foi observada redução da motilidade espermática na dose de 100 nM de liraglutida (13A). Enquanto que a vitalidade espermática não apresentou alteração nas concentrações de liraglutida utilizadas (13B).

Figura 13. Motilidade e vitalidade espermática em diferentes concentrações de liraglutida



Legenda: Porcentagem de motilidade progressiva (13A) e vitalidade (13B) espermáticas em diferentes concentrações de liraglutida. Valores representados como média \pm erro padrão da média, n=16.

4.2.3 Presença do receptor de GLP-1 no testículo de camundongos

Através da técnica de western blotting foi observada a presença do receptor de GLP-1 tanto no testículo de camundongos (Figura 14).

Figura 14. Expressão do receptor de GLP-1 em testículo de camundongos



Legenda: Expressão protéica de GLP-1 em tecido testicular de camundongos (n=12)

4.3 **Relato de caso**

Um homem de 35 anos apresentou-se à clínica Vida Centro de Fertilidade em novembro de 2011. O casal apresentava infertilidade primária e idiopática há 1 ano. Ele não apresentava histórico familiar de infertilidade, relatou ingerir bebida alcoólica socialmente, praticar exercícios físicos duas vezes por semana, ter função sexual normal e apresentou ultrassonografia com Doppler da bolsa escrotal normal. Sua esposa também foi investigada e apresentou triagem de exames de sangue e níveis hormonais normais, não apresentou infecções sorológicas, não teve alterações nos exames de ultrassom pélvico, histerossalpingografia e histeroscopia.

O primeiro espermograma do paciente foi realizado em novembro de 2011 e apresentou todos os parâmetros espermáticos normais (Tabela 1). O paciente retornou após 4 meses (março de 2012) para realizar a técnica de inseminação intrauterina e sua análise seminal apresentou concentração espermática de 0.2×10^6 espermatozoides por ml, com 100% dos espermatozoides imóveis (Tabela 1). Para confirmar este resultado, foi feita nova coleta seminal após 6 horas. Nesta nova coleta não foram encontrados espermatozoides na amostra (Tabela 1). Os médicos da clínica cancelaram o procedimento de inseminação intrauterina e iniciaram nova investigação do paciente. O paciente relatou que estava em uso de 0.6 mg de liraglutida (comercialmente conhecido como Victoza) e que não estava em uso de qualquer outra medicação, não havia mudado seu estilo de vida, nem havia apresentado gripe nem febre. Seu único histórico de doença na família era de obesidade do pai. O paciente

havia iniciado o tratamento com liraglutida em outubro de 2011, ou seja, 1 mês antes de sua primeira coleta que tinha seus parâmetros seminais normais. A razão pela qual o paciente havia iniciado o tratamento com liraglutida era a associação de seu elevado peso (100 kg) e um leve aumento nos níveis de glicose. Uma vez que o liraglutida era a única medicação que o paciente estava tomando, ele foi orientado a ter uma consulta com sua endocrinologista para analisar a possibilidade de suspender o tratamento. Ao todo, o paciente havia usado liraglutida por 5 meses e havia emagrecido 2 kg neste período.

Dois meses após a interrupção do tratamento com liraglutide, foi realizado novo espermograma, que apresentou parâmetros espermáticos alterados (concentração espermática de 0.01×10^6 espermatozoides por ml, sendo todos imóveis) (Tabela 1). Em seguida, retornou 2 meses depois (ou seja, 4 meses após interrupção do tratamento) e sua concentração espermática ainda não estava normal, mas apresentou 8.7×10^6 espermatozoides por ml, com porcentagem normal de motilidade espermática (Tabela 1). Por precaução esta amostra foi congelada e o casal iniciou o ciclo de fertilização *in vitro*.

O paciente retornou 1 mês depois (ou seja, 5 meses após interrupção do tratamento), no dia da coleta oocitária. O paciente fez nova coleta, que apresentou todos os parâmetros espermáticos normais (Tabela 1). Os oócitos foram inseminados com esta amostra fresca e, dentre os 4 oócitos coletados, 3 eram maduros e foram usados para o procedimento de injeção intracitoplasmática de espermatozoide (ICSI). Todos os oócitos foram fertilizados e no dia 2 de desenvolvimento embrionário foram transferidos 2 embriões classe A, restando 1 embrião que foi vitrificado em estágio de blastocisto. O casal teve uma gestação de sucesso e gerou dois bebês após 36 semanas.

Tabela 1. Parâmetros espermáticos do paciente azoospérmico em uso de liraglutida

Data	Volume seminal (mL)	Concentração espermática ($\times 10^6$ /mL)	Motilidade espermática (%A+B)	Morfologia espermática (%)	Concentração de leucócitos ($\times 10^6$ /mL)
Novembro-11	2.5	51.6	55.6	8	0.8
Março-12	3.0	0.2	0.0	-	-
Março-12	1.1	0.0	0.0	-	-
Mai-12	3.0	0.01	0.0	-	0.6
Julho-12	2.7	8.7	48.1	2.5	0.1
Agosto-12	3.2	28	32.1	-	-
Valores de Referência*	≥ 1.5	≥ 15	≥ 32	≥ 4	≤ 1.0

Legenda: Figura demonstrando as datas e os parâmetros espermáticos apresentados em cada coleta seminal do paciente durante o tratamento e investigação de seu caso. *Valores de referência de acordo com a OMS 2010. Fonte: Fontoura P. et al, 2014

5 DISCUSSÃO

Enquanto que o dano induzido pela criopreservação já é bem documentado, afetando a motilidade, vitalidade, morfologia e a capacidade de fertilização dos espermatozoides, o possível dano ao DNA ocasionado pelo congelamento ainda não está confirmado (Di Santo M et al., 2012). Os estudos ainda são contraditórios no que diz respeito ao congelamento afetar e o quanto afeta a integridade do DNA espermático (Di Santo et al, 2012; Paoli et al., 2014).

Alguns autores relataram um dano significativo ao DNA espermático ocasionado pelo congelamento (Sharma et al., 2015, Meamar et al., 2012), enquanto outros afirmam não haver prejuízo à integridade do material genético (Tataru et al., 2015; Vutyavanich et al., 2010). Esta divergência de resultados pode ser explicada por diversos fatores: (1) estudos selecionarem seus pacientes de forma diferente, por exemplo, no estudo de Ozkavukcu e colaboradores haviam pacientes tabagistas em 30% dos participantes do estudo (Ozkavukcu S. Et al., 2008) (Ozkavuku et al., 2008), e sabe-se que o tabagismo altera a fDNA (Basu et al., 2015); (2) diferença no preparo seminal previamente ao congelamento, por exemplo, alguns estudos utilizaram o sêmen bruto (Olaciregui et al., 2015), outros realizaram o isolamento de espermatozoides por lavagem (Khodayari et al., 2014), outros pela técnica de DGC (Ghorbani et al., 2015); (3) diferentes crioprotetores; (4) diferentes protocolos de congelamento e descongelamento; (5) e a aplicação de diferentes técnicas de avaliação da taxa de fragmentação do DNA espermático.

Em nosso estudo observamos um aumento da fragmentação do DNA espermático após ciclo de congelamento e descongelamento dos espermatozoides, corroborando com alguns estudos anteriores. Para reduzir a variabilidade das amostras e dos resultados, nós selecionamos apenas pacientes sem doenças e que não estavam em uso de nenhuma medicação. Além disso, avaliamos apenas amostras de pacientes normospérmicos segundo os critérios da OMS, uma vez que alguns autores acreditam que espermatozoides de homens inférteis são menos resistentes ao congelamento, apresentando piores resultados em relação à fragmentação do DNA espermático após descongelamento, comparados a pacientes férteis (Di Santo et al., 2012; Kalthur et al., 2008).

Nós utilizamos sêmen bruto para o congelamento partindo do princípio de que o sêmen bruto possui grande defesa antioxidante que protege o espermatozoide durante o congelamento contra o estresse oxidativo, que por sua vez, poderia induzir o aumento da fragmentação do DNA espermático (Saritha e Bongso, 2001; Martinez-Soto et al., 2013).

Nossos resultados podem ser explicados por evidências anteriores de que o congelamento leva à formação de cristais de gelo que levam à ruptura da membrana plasmática, organelas e membrana nuclear, atingindo o DNA da célula (Petym et al., 2014; Di Santo et al., 2012). O mecanismo pelo qual essas alterações ocorrem ainda não é conhecido, no entanto, uma possível razão para este dano induzido pelo congelamento seria o estresse oxidativo (Thomson et al., 2009) e ou a ativação de cascatas apoptóticas (Zribi et al., 2010).

A literatura ainda é controversa em relação à capacitação prévia ao congelamento. Alguns pesquisadores observam melhores resultados de fDNA mixing the cryoprotector directly with raw semen, defendendo a hipótese de que o plasma seminal protege os espermatozoides durante os processos de congelamento e descongelamento, uma vez que ele é rico em enzimas antioxidantes (Saritha e Bongso, 2001; Martínéz-Soto et al. 2012) (Saritha e Bongso, 2001; Martinez-Soto, 2013). Outros pesquisadores defendem que o plasma seminal precisa ser removido previamente ao congelamento, caso contrário pode causar prejuízos à motilidade e vitalidade dos espermatozoides pós descongelamento (Morshedi et al. 2001; Zorn et al. 2010; Brugnon et al. 2013) (Zorn et al., 2010; Brugnon et al., 2013).

Nós também comparamos as taxas de fDNA espermático utilizando sêmen bruto e capacitado para o congelamento. Nossos resultados demonstraram que a capacitação espermática previamente ao congelamento reduziu as taxas de fDNA. Como técnica de capacitação foi utilizado o gradiente de diferentes densidades, seguido de lavagem e swim-up do pellet. É provável que o melhor resultado encontrado na amostra que foi capacitada previamente ao congelamento seja atribuído à hipótese de que espermatozoides morfológicamente alterados são mais susceptíveis aos danos durante o congelamento, em comparação com espermatozoides com morfologia normal (Kalthur et al., 2008). Além disso, alterações na cabeça e na organização da cromatina podem alterar propriedades físicas da membrana e, com isso, alterar a tolerância ao “cold stress” (Kalthur et al., 2008; Di Santo et al., 2012). Ao selecionar uma subpopulação de espermatozoides através da capacitação, temos uma amostra com maior qualidade após o descongelamento. A capacitação permite a seleção de espermatozoides com maior qualidade e remove o plasma seminal, o qual contém debris, células da linhagem espermática, leucócitos, espermatozoides imaturos, apoptóticos e inviáveis e outros componentes que podem aumentar o estresse oxidativo e apoptose, durante o ciclo de congelamento e descongelamento (BRUGNON et al, 2013).

Diversos estudos têm buscado mecanismos para atenuar os efeitos deletérios causados pelo congelamento (Zhang et al., 2015; Mata-Campuzano et al., 2015). Alguns trabalhos buscam um melhor preparo seminal prévio ao congelamento, alguns buscam um melhor

protocolo de congelamento e descongelamento e outros os melhores agentes crioprotetores. Com o conhecimento de que o estresse oxidativo é um dos fatores que contribui para os fatores deletérios durante a criopreservação, trabalhos recentes vêm buscando substâncias crioprotetoras que possam minimizar esses danos (Bateni et al., 2014).

Devido à sua exclusiva composição estrutural, de relativamente pequena quantidade de citoplasma, que leva à redução da concentração de enzimas antioxidantes; e membrana plasmática rica em ácidos graxos poliinsaturados, tornando-a mais suscetível à peroxidação lipídica, o espermatozoide se torna particularmente mais vulnerável à ação das EROs (Aitken et al., 2010; Helfenstein et al., 2010). Os efeitos deletérios do estresse oxidativo podem acarretar diversas alterações estruturais dos espermatozoides, como a fragmentação protéica, a peroxidação lipídica e a fragmentação da membrana e do DNA espermático (Cocuzza et al., 2007). Este é o primeiro estudo que avalia os possíveis efeitos crioprotetores da leptina nos espermatozoides.

A leptina é um hormônio peptídico produzido principalmente pelo tecido adiposo. Suas funções mais amplamente conhecidas estão relacionadas à obesidade, levando à inibição do apetite, da ingestão alimentar e à estimulação do gasto energético. No entanto, já foi mostrada sua atuação nos diversos sistemas do organismo, dentre eles, o sistema reprodutor (Li et al., 2009). A presença da leptina e de seu receptor em espermatozoides já foi descrita anteriormente (Aquila et al., 2005; Jope et al., 2003; Li et al., 2009) e confirmada neste trabalho, no entanto, seu papel na espermatogênese e no espermatozoide ainda não está completamente esclarecido. Trabalhos da literatura mostram resultados conflitantes sobre o papel da leptina no número e qualidade dos espermatozoides. Lampiao e Du Plessis encontraram um aumento da motilidade total e progressiva, da reação acrossômica, assim como da produção de NO, após incubação de espermatozoides com leptina (Lampiao e Du Plessis, 2008). Em contraste, Li e colaboradores não observaram efeitos significativos da leptina sobre a motilidade espermática, a porcentagem de espermatozoides capacitados e que sofreram reação acrossômica, após incubação com leptina (Aquila et al., 2005; Jope et al., 2003; Li et al., 2009). Alguns trabalhos sugerem que a leptina tenha ação sobre o estresse oxidativo (Solinas et al., 2010; Yamagishi et al., 2001; Zheng et al., 2010).

Nosso estudo demonstrou que a incubação dos espermatozoides com leptina previamente ao congelamento pode levar ao aumento da atividade das enzimas antioxidantes SOD e glutatona, mas não da catalase. As principais enzimas antioxidantes são a SOD, a catalase e a glutatona, no entanto, a catalase é bastante efetiva quando se tem um alto nível de

estresse oxidativo e especialmente importante em casos de redução da concentração ou da atividade da enzima glutathiona peroxidase (Paravicini e Touyz, 2008).

Um provável mecanismo de ação pelo qual a leptina pode agir contra o estresse oxidativo é através da dissipação do excesso de energia, através de mecanismos termogênicos e, assim, evitando o desenvolvimento de potencial de membrana da mitocôndria excessivo (Solinas G., 2010). Em seu estudo, Zheng et al demonstrou que a leptina teve efeito antiapoptótico em cardiomiócitos, pelo aumento da atividade da SOD. A leptina induziu a expressão gênica da SOD2 além de ativar diretamente o promotor da SOD2 em cardiomiócitos (Zheng et al., 2010). Este efeito foi específico para a SOD2, a qual é localizada na mitocôndria, enquanto que a SOD 1, localizada no citoplasma, não foi alterada após o tratamento com leptina.

Apesar da expectativa da leptina levar a uma redução das EROs – uma vez que foi observada a redução da atividade das enzimas antioxidantes – não foram observadas alterações relacionadas à peroxidação lipídica ou à oxidação de proteínas. Em controversa, a leptina induziu a peroxidação lipídica em células endoteliais, levando ao aumento do potencial mitocondrial e consequente elevação da produção mitocondrial de EROs (Yamagishi SI et al, 2001). Neste estudo, a leptina também potencializou a redução da fDNA em amostras capacitadas, em comparação a amostras capacitadas, sem adição de leptina. Podemos especular que a redução da fDNA após incubação com leptina possa ser explicada pelo aumento da defesa antioxidante. Desta forma, minimizando os efeitos deletérios do estresse oxidativo, que é uma das principais causas do aumento da fragmentação do DNA (Sieme et al., 2015). Em resumo, nossos resultados mostraram que a leptina apresentou um efeito crioprotetor para os espermatozoides, quando adicionada antes do congelamento, reduzindo os efeitos deletérios da criopreservação.

O liraglutida é um agonista do receptor do GLP-1 e seus efeitos adversos incluem pancreatite (Knezevich et al., 2012) e poliartrite (Ambrosio et al., 2014). Neste relato de caso, o liraglutida causou a interrupção da produção de espermatozoides, a qual foi completamente restaurada após 5 meses da suspensão da medicação. Sabe-se que a espermatogênese é um processo contínuo e seu ciclo completo é de 72 dias. O paciente foi avaliado 4 meses após a interrupção do liraglutida e, nesta data, não apresentava todos os parâmetros espermáticos normais, mas já tinha retomado a produção espermática e apresentava motilidade espermática normal. Dentro de 5 meses da interrupção do liraglutida, o paciente recuperou todos os parâmetros seminais, sendo o período de 5 meses o equivalente a dois ciclos completos de espermatogênese.

O FDA publicou recentemente uma nota onde consta que, dentre 11.308 indivíduos com diferentes efeitos adversos com o uso de liraglutida, 2 deles reportaram uma redução da concentração espermática. No entanto, não foram reportados detalhes na publicação: se esses pacientes estavam sob investigação de infertilidade, o tempo em que fizeram uso do medicamento e os valores dos parâmetros seminais antes e após o uso do liraglutida. Com isso, ainda se tem pouco conhecimento sobre os efeitos adversos do liraglutida no sistema reprodutor masculino.

A primeira evidência do papel do GLP-1 no sistema reprodutor foi em um estudo com camundongos *knock-out* para o receptor de GLP-1, sendo observado um atraso da puberdade em fêmeas e redução do peso das gônadas de machos, mesmo na presença de níveis de hormônios esteróides normais em ambos os sexos (Mac Lusky et al., 2000). Em homens, a infusão de GLP-1 reduziu a frequência de pulsos de secreção de testosterona, sugerindo um efeito inibitório da secreção de testosterona, mesmo em níveis inalterados de LH (Jeibmann et al., 2005).

A partir dos resultados obtidos no relato de caso, se fez necessário aprofundar a avaliação dos efeitos do liraglutida sobre o sistema reprodutor masculino. Em nosso estudo observamos a presença do receptor do GLP-1 em espermatozoides de humanos e em testículos de camundongos. Com isso, o liraglutida pode ter ação tanto sobre a espermatogênese através da ação em receptores do testículo, como também pode ter ação direta sobre os espermatozoides. Outro ponto que pode ser estudado é o efeito do liraglutida sobre os hormônios que participam da regulação hormonal clássica do sistema reprodutor e sobre outros hormônios que também atuam nesta regulação.

Para avaliar seu efeito sobre os espermatozoides foi feita incubação *in vitro* com diversas dosagens do liraglutida. Nossos resultados mostraram que o liraglutida apresentou efeito direto e deletério sobre a função espermática, reduzindo os parâmetros de motilidade progressiva após período *overnight* de incubação. Não houve alteração da vitalidade espermática nas concentrações utilizadas. Este resultado é possível, uma vez que detectamos a expressão do receptor de GLP-1 em pool de espermatozoides de indivíduos normospermicos.

Tendo em vista a presença do receptor do GLP-1 no tecido testicular de camundongos, podemos sugerir que o liraglutida tenha efeitos sobre a espermatogênese. O resultado encontrado pode oferecer discussão durante o esclarecimento sobre o caso do paciente que ficou temporariamente azoospermico, durante período em que fez uso do liraglutida. Ainda se faz necessária a investigação da presença do receptor do GLP-1 em testículos de humanos.

Nosso trabalho é o primeiro a demonstrar a expressão protéica do receptor do GLP-1 em espermatozoides humanos e em tecido testicular de camundongos, sugerindo um papel do GLP-1 sobre a espermatogênese e sobre a função espermática.

Nossos resultados ainda são preliminares no que diz respeito ao efeito do liraglutida sobre a fertilidade masculina. Ainda não é possível indicar o mecanismo pelo qual o liraglutida age, reduzindo a produção de espermatozoides ou reduzindo a qualidade dos mesmos. Apenas podemos afirmar que durante a investigação da fertilidade e o tratamento de um casal deve-se atentar para o uso do liraglutida.

CONCLUSÃO

- A fDNA aumentou significativamente após o ciclo de congelamento e descongelamento dos espermatozoides, mostrando que as análises devem ser realizadas no material a fresco a fim de evitar possíveis erros de diagnóstico.
- A capacitação espermática previamente ao congelamento levou a uma redução da taxa de fDNA.
- Através da análise dos hormônios leptina e GLP-1, verificamos que ambos estão envolvidos na regulação da função espermática.
- A leptina mostrou um efeito crioprotetor nos espermatozoides, através da redução da fDNA espermático e do aumento da atividade das enzimas antioxidantes, o que pode reduzir efeitos deletérios, se adicionada antes do congelamento.
- No relato de caso descrito, o liraglutida causou uma interrupção da espermatogênese, a qual foi completamente restaurada após 5 meses da suspensão do medicamento.
- O liraglutida reduziu a taxa de motilidade progressiva dos espermatozoides.
- Tanto espermatozoides humanos, como testículos de camundongos expressam o receptor do GLP-1, mostrando a possível atuação do GLP-1.

REFERÊNCIAS

- Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* 1984;105:121-6.
- Aitken RJ, Baker MA, De Iuliis GN, Nixon B. New insights into sperm physiology and pathology. *Handb Exp Pharmacol.* 2010(198):99-115.
- Ambrosio ML, Monami M, Sati L, Marchionni N, Di Bari M, Mannucci E. GLP-1 receptor agonist-induced polyarthritis: a case report. *Acta Diabetologica* 2014; Oct 25. [Epub ahead of print]
- Aquila S, Giordano F, Guido C, Rago V, Carpino A. Nitric oxide involvement in the acrosome reaction triggered by leptin in pig sperm. *Reprod Biol Endocrinol.* 2011;9:133.
- Bannister JV, Calabrese L. Assays for superoxide dismutase. *Methods Biochem Anal.* 1987;32:279-312.
- Basu S, Pant M, Rachana R. Protective effect of *Salacia oblonga* against tobacco smoke-induced DNA damage and cellular changes in pancreatic beta-cells. *Pharm Biol.* 2015 Sep 25:1-7.
- Batani Z, Azadi L, Tavalaee M, Kiani-Esfahani A, Fazilati M, Nasr-Esfahani MH. Addition of Tempol in semen cryopreservation medium improves the post-thaw sperm function. *Syst Biol Reprod Med.* 2014 Aug;60(4):245-50.
- Brincat D, Catania S, Wismayer PS, Calleja-Agius J. Male factors in ART outcome prediction. *Gynecol Endocrinol.* 2015;31(3):169-75.
- Brugnon F, Ouchchane L, Pons-Rejraji H, Artonne C, Farigoule M, Janny L. Density gradient centrifugation prior to cryopreservation and hypotaurine supplementation improve post-thaw quality of sperm from infertile men with oligoasthenoteratozoospermia. *Hum Reprod.* 2013 Aug;28(8):2045-57.
- Cocuzza M, Sikka SC, Athayde KS, Agarwal A. Clinical relevance of oxidative stress and sperm chromatin damage in male infertility: an evidence based analysis. *Int Braz J Urol.* 2007 Sep-Oct;33(5):603-21.
- Di Santo M, Tarozzi N, Nadalini M, Borini A. Human Sperm Cryopreservation: Update on Techniques, Effect on DNA Integrity, and Implications for ART. *Adv Urol.* 2012;2012:854837.
- Dimitriadis F, Tsiampali C, Chaliasos N, Tsounapi P, Takenaka A, Sofikitis N. The Sertoli cell as the orchestra conductor of spermatogenesis: spermatogenic cells dance to the tune of testosterone. *Hormones (Athens).* 2015;14(4):479-503.
- Draper HH, Hadley M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* 1990;186:421-31.
- Ellman GL. Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys.* 1959 May;82(1):70-7.

FDA communication - <http://www.ehealthme.com/ds/victoza/sperm+count+decreased>, acessado em outubro de 2013.

Feijo CM, Esteves SC. Diagnostic accuracy of sperm chromatin dispersion test to evaluate sperm deoxyribonucleic acid damage in men with unexplained infertility. *Fertil Steril*. 2014 Jan;101(1):58-63.

Flohe L, Gunzler WA. Assays of glutathione peroxidase. *Methods Enzymol*. 1984;105:114-21.

Fontoura P

Gavriliouk D, Aitken RJ. Damage to Sperm DNA Mediated by Reactive Oxygen Species: Its Impact on Human Reproduction and the Health Trajectory of Offspring. *Adv Exp Med Biol*. 2015;868:23-47.

Ghorbani M, Amiri I, Khodadadi I, Fattahi A, Atabakhsh M, Tavilani H. Influence of BHT inclusion on post-thaw attributes of human semen. *Syst Biol Reprod Med*. 2015 Jan;61(1):57-61.

Haron MN, D'Souza UJ, Jaafar H, Zakaria R, Singh HJ. Exogenous leptin administration decreases sperm count and increases the fraction of abnormal sperm in adult rats. *Fertil Steril*. 2010 Jan;93(1):322-4.

Helfenstein F, Losdat S, Moller AP, Blount JD, Richner H. Sperm of colourful males are better protected against oxidative stress. *Ecol Lett*. 2010 Feb;13(2):213-22.

Jope T, Lammert A, Kratzsch J, Paasch U, Glander HJ. Leptin and leptin receptor in human seminal plasma and in human spermatozoa. *Int J Androl*. 2003 Dec;26(6):335-41.

Kalthur G, Adiga SK, Upadhya D, Rao S, Kumar P. Effect of cryopreservation on sperm DNA integrity in patients with teratospermia. *Fertil Steril*. 2008 Jun;89(6):1723-7.

Khodayari Naeini Z, Hassani Bafrani H, Nikzad H. Evaluation of ebselen supplementation on cryopreservation medium in human semen. *Iran J Reprod Med*. 2014 Apr;12(4):249-56.

Knezevich E, Crnic T, Kershaw S, Drincic A. Liraglutide-associated acute pancreatitis. *Am J Health Syst Pharm* 2012;69(5):386-9.

Lampiao F, du Plessis SS. Insulin and leptin enhance human sperm motility, acrosome reaction and nitric oxide production. *Asian J Androl*. 2008 Sep;10(5):799-807.

Lewis SE, John Aitken R, Conner SJ, Iuliis GD, Evenson DP, Henkel R, Giwercman A, Gharagozloo P. The impact of sperm DNA damage in assisted conception and beyond: recent advances in diagnosis and treatment. *Reprod Biomed Online*. 2013;27(4):325-37.

Li HW, Chiu PC, Cheung MP, Yeung WS, O WS. Effect of leptin on motility, capacitation and acrosome reaction of human spermatozoa. *Int J Androl*. 2009 Dec;32(6):687-94.

Marathe CS, Rayner CK, Jones KL, Horowitz M. Glucagon-like peptides 1 and 2 in health and disease: A review. *Peptides* 2013;44:75-86.

Martinez-Soto JC, Landeras J, Gadea J. Spermatozoa and seminal plasma fatty acids as predictors of cryopreservation success. *Andrology*. 2013 May;1(3):365-75.

Mata-Campuzano M, Alvarez-Rodriguez M, Alvarez M, Tamayo-Canul J, Anel L, de Paz P, et al. Post-thawing quality and incubation resilience of cryopreserved ram spermatozoa are affected by antioxidant supplementation and choice of extender. *Theriogenology*. 2015 Mar 1;83(4):520-8.

Meamar M, Zribi N, Cambi M, Tamburrino L, Marchiani S, Filimberti E, et al. Sperm DNA fragmentation induced by cryopreservation: new insights and effect of a natural extract from *Opuntia ficus-indica*. *Fertil Steril*. 2012 Aug;98(2):326-33.

Moore e Persaud. Moore, K.; Persaud, T.; Torchia, M. O início do desenvolvimento humano: primeira semana. In: *Embriologia clínica*. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.

Neri QV, Lee B, Rosenwaks Z, Machaca K, Palermo GD. Understanding fertilization through intracytoplasmic sperm injection (ICSI). *Cell Calcium*. 2014;55(1):24-37.

Neto FT, Bach PV, Najari BB, Li PS, Goldstein M. Spermatogenesis in humans and its affecting factors. *Semin Cell Dev Biol*. 2016 [Epub ahead of print]

Olaciregui M, Luno V, Gonzalez N, De Blas I, Gil L. Freeze-dried dog sperm: Dynamics of DNA integrity. *Cryobiology*. 2015 Oct;71(2):286-90.

Ozkavukcu S, Erdemli E, Isik A, Oztuna D, Karahuseyinoglu S. Effects of cryopreservation on sperm parameters and ultrastructural morphology of human spermatozoa. *J Assist Reprod Genet*. 2008 Aug;25(8):403-11.

Paoli D, Lombardo F, Lenzi A, Gandini L. Sperm cryopreservation: effects on chromatin structure. *Adv Exp Med Biol*. 2014;791:137-50.

Paravicini TM, Touyz RM. NADPH oxidases, reactive oxygen species, and hypertension: clinical implications and therapeutic possibilities. *Diabetes Care*. 2008 Feb;31 Suppl 2:S170-80.

Petyim S, Neungton C, Thanaboonyawat I, Laokirkkiat P, Choavaratana R. Sperm preparation before freezing improves sperm motility and reduces apoptosis in post-freezing-thawing sperm compared with post-thawing sperm preparation. *J Assist Reprod Genet*. 2014 Dec;31(12):1673-80.

Sakkas D, Alvarez JG. Sperm DNA fragmentation: mechanisms of origin, impact on reproductive outcome, and analysis. *Fertil Steril*. 2010 Mar 1;93(4):1027-36.

Saritha KR, Bongso A. Comparative evaluation of fresh and washed human sperm cryopreserved in vapor and liquid phases of liquid nitrogen. *J Androl*. 2001 Sep-Oct;22(5):857-62.

Schlatt S e Ehmcke J. Regulation of spermatogenesis: An evolutionary biologist's perspective. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 2014 May;29:2-16.

Sharma R, Kattoor AJ, Ghulmiyyah J, Agarwal A. Effect of sperm storage and selection techniques on sperm parameters. *Syst Biol Reprod Med*. 2015 Jan;61(1):1-12.

Sieme H, Oldenhof H, Wolkers WF. Sperm Membrane Behaviour during Cooling and Cryopreservation. *Reprod Domest Anim*. 2015 Sep;50 Suppl 3:20-6.

Sieme H, Oldenhof H, Wolkers WF. Sperm Membrane Behaviour during Cooling and Cryopreservation. *Reprod Domest Anim*. 2015 Sep;50 Suppl 3:20-6.

Sieme H, Oldenhof H, Wolkers WF. Mode of action of cryoprotectants for sperm preservation. *Anim Reprod Sci*. 2016 [Epub ahead of print]

Solinas G. Leptin signalling coordinates lipid oxidation with thermogenesis and defence against oxidative stress. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2010 Oct;37(10):953-4.

Tataru DA, Markova EV, Osadchuk LV, Sheina EV, Svetlakov AV. [the Optimal Conditions of Storage of Spermatozoa for Analysis of DNA Fragmentation]. *Klin Lab Diagn*. 2015 Apr;60(4):52-6.

Thomson LK, Fleming SD, Aitken RJ, De Iuliis GN, Zieschang JA, Clark AM. Cryopreservation-induced human sperm DNA damage is predominantly mediated by oxidative stress rather than apoptosis. *Hum Reprod*. 2009 Sep;24(9):2061-70.

Vutyavanich T, Piromlertamorn W, Nunta S. Rapid freezing versus slow programmable freezing of human spermatozoa. *Fertil Steril*. 2010 Apr;93(6):1921-8.

Yamagishi SI, Edelstein D, Du XL, Kaneda Y, Guzman M, Brownlee M. Leptin induces mitochondrial superoxide production and monocyte chemoattractant protein-1 expression in aortic endothelial cells by increasing fatty acid oxidation via protein kinase A. *J Biol Chem*. 2001 Jul 6;276(27):25096-100.

Yeste M, Estrada E, Rocha LG, Marin H, Rodriguez-Gil JE, Miro J. Cryotolerance of stallion spermatozoa is related to ROS production and mitochondrial membrane potential rather than to the integrity of sperm nucleus. *Andrology*. 2015 Mar;3(2):395-407.

Zhang W, Li F, Cao H, Li C, Du C, Yao L, et al. Protective effects of l-carnitine on astheno- and normozoospermic human semen samples during cryopreservation. *Zygote*. 2015 Jun 17:1-8.

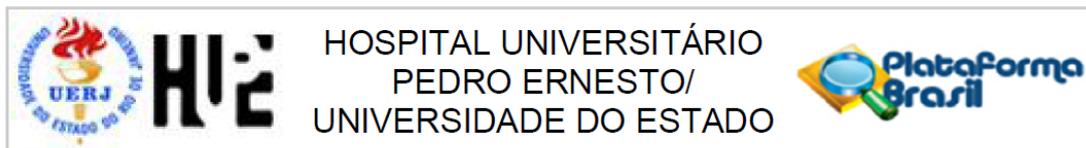
Zhao J, Zhang Q, Wang Y, Li Y. Whether sperm deoxyribonucleic acid fragmentation has an effect on pregnancy and miscarriage after in vitro fertilization/intracytoplasmic sperm injection: a systematic review and meta-analysis. *Fertil Steril*. 2014 Oct;102(4):998-1005 e8.

Zheng J, Fang J, Yin YJ, Wang XC, Ren AJ, Bai J, et al. Leptin protects cardiomyocytes from serum-deprivation-induced apoptosis by increasing anti-oxidant defence. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2010 Oct;37(10):955-62.

Zorn B, Ihan A, Kopitar AN, Kolbezen M, Sesek-Briski A, Meden-Vrtovec H. Changes in sperm apoptotic markers as related to seminal leukocytes and elastase. *Reprod Biomed Online*. 2010 Jul;21(1):84-92.

Zribi N, Feki Chakroun N, El Euch H, Gargouri J, Bahloul A, Ammar Keskes L. Effects of cryopreservation on human sperm deoxyribonucleic acid integrity. *Fertil Steril*. 2010 Jan;93(1):159-66.

APÊNDICE A – Aprovação no Comitê de Ética



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: "CORRELAÇÃO ENTRE A QUALIDADE DE ESPERMATOZOIDES E O SUCESSO DE GRAVIDEZ APÓS FERTILIZAÇÃO IN VITRO: O PAPEL DA LEPTINA E DO ESTRADIOL NA FUNÇÃO ESPERMÁTICA"

Pesquisador: Paula Fontoura Coelho de Souza

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 22864513.9.0000.5259

Instituição Proponente: Hospital Universitário Pedro Ernesto/UERJ

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 432.202

Data da Relatoria: 09/10/2013

Apresentação do Projeto:

Projeto bem estruturado

Objetivo da Pesquisa:

"Demonstrar se há correlação entre os parâmetros padrões de avaliação dos espermatozoides, o estresse oxidativo, a taxa de fragmentação do DNA espermático e as taxas de esterilização, morfologia embrionária e taxas de implantação, gravidez e gestação. Além disso, esclarecer o papel da leptina e do estradiol sobre a qualidade e função espermáticas."

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

não ha riscos ou beneficios

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

estudo transversal. "Serão utilizadas 80 amostras seminais provenientes de pacientes do Laboratório de Reprodução Assistida da clínica Vida Centro de Fertilidade, que estejam em investigação de infertilidade conjugal ou em tratamento de reprodução assistida."

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

folha de rosto do IBRAG.

Endereço: Avenida 28 de Setembro 77 - Térreo

Bairro: Vila Isabel

CEP: 20.551-030

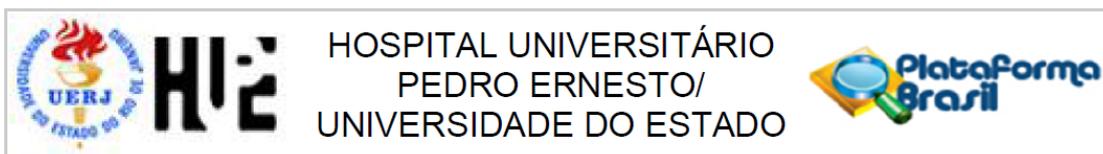
UF: RJ

Município: RIO DE JANEIRO

Telefone: (21)2868-8253

Fax: (21)2264-0853

E-mail: cep-hupe@uerj.br



Continuação do Parecer: 432.202

Recomendações:

sugiro retirar do termo de consentimento

"Benefícios: Este estudo pode beneficiar os pacientes que buscam tratamento de infertilidade conjugal, trazendo melhora durante a investigação da infertilidade masculina, a interpretação dos resultados dos exames e os diagnósticos dos pacientes. Como consequência, estes benefícios contribuem também para a melhora na conduta dos profissionais especializados e no tratamento de reprodução assistida, uma vez que novas ferramentas diagnósticas e novas intervenções podem ser utilizadas."

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

material coletado fora do HUPE/uerj (em clinica particular).

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

1. Comunicar toda e qualquer alteração do projeto e termo de consentimento livre e esclarecido. Nestas circunstâncias a inclusão de pacientes deve ser temporariamente interrompida até a resposta do Comitê, após análise das mudanças propostas. 2. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes. 3. O Comitê de Ética solicita a V. S^a., que ao término da pesquisa encaminhe a esta comissão um sumário dos resultados do projeto.

RIO DE JANEIRO, 22 de Outubro de 2013

Assinador por:
WILLE OIGMAN
 (Coordenador)

Endereço: Avenida 28 de Setembro 77 - Térreo
Bairro: Vila Isabel **CEP:** 20.551-030
UF: RJ **Município:** RIO DE JANEIRO
Telefone: (21)2868-8253 **Fax:** (21)2264-0853 **E-mail:** cep-hupe@uerj.br

APÊNDICE B – Declaração de Colaboração com a clínica Vida Centro de Fertilidade

Venho por meio desta, declarar que Paula Fontoura Coelho de Souza, estagiária do Laboratório de Morfometria, Metabolismo e Doenças Cardiovasculares do Departamento de Anatomia da Universidade do Estado do Rio de Janeiro, está autorizada a utilizar amostras seminais de pacientes do Laboratório de Reprodução Assistida do Centro de Fertilidade Vida. As amostras poderão ser utilizadas para o desenvolvimento de seu projeto de pesquisa de doutoramento intitulado **"Correlação entre qualidade de espermatozóides e o sucesso de gravidez após fertilização *in vitro*"**, desde que os pacientes assinem o termo de consentimento livre e esclarecido, declarando estarem cientes e de acordo com sua participação no projeto de pesquisa.

Rio de Janeiro, 03 de abril de 2012.

Dr.ª Maria Lúcia de Almeida Cardoso
CRM 52.41511-9

Vida - Centro de Fertilidade da Rede D'Or
Av. das Américas, 6.205 (MD.X) - salas 303/305
Barra da Tijuca - Rio de Janeiro, RJ - CEP: 22793-080
Tels: (21) 2429-6140 / 2484-8564 / 2484-2918 / 2493-0758
www.vidafertil.com.br • atendimento@vidafertil.com.br

APÊNDICE C – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para publicação do relato de caso

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

“EFEITO DO LIRAGLUTIDA (VICTOZA) SOBRE A FERTILIDADE MASCULINA”

Pesquisador Responsável: Cristiane da Fonte Ramos
Doutoranda: Paula Fontoura Coelho de Souza
Instituição a que pertence o Pesquisador Responsável: UERJ
Telefone para contato: (21) 98178-0305

INFORMAÇÕES SOBRE O ESTUDO

O Victoza (liraglutida) é comumente utilizado para o tratamento de diabetes do tipo 2 e obesidade. Até o momento não há nenhum relato de que este medicamento afete a fertilidade masculina. Este estudo tem como objetivo a divulgação de um medicamento que pode afetar a fertilidade masculina, trazendo conhecimento para a investigação dos casais que buscam tratamento de infertilidade conjugal. Este relato não oferece qualquer tipo de risco ao paciente, visto que é um relato anônimo.

Eu, _____, fui devidamente informado e esclarecido sobre o estudo acima do qual me disponho fazer parte, como voluntário. Declaro que li o relato de caso e concordo com a publicação do mesmo. Estou ciente de que não terei direito a nenhuma remuneração, já que minha participação no projeto é voluntária e sem interesse financeiro. Estou ciente da confidencialidade das informações geradas e de que a pesquisa trabalha com o anonimato. Também estou ciente de que esta pesquisa poderá ser publicada, assegurando-se a confidencialidade dos indivíduos nela envolvidos. A qualquer momento, terei o direito de conhecer a publicação do estudo, se assim desejar.

Rio de Janeiro, _____ de _____ de 20_____.

(Assinatura do Paciente)

(Assinatura do Pesquisador)

APÊNDICE D – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Liraglutida)**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

Projeto de Pesquisa: “O PAPEL DA LEPTINA E DO LIRAGLUTIDA NA FUNÇÃO ESPERMÁTICA”

Pesquisador Responsável: Cristiane da Fonte Ramos

Doutoranda: Paula Fontoura Coelho de Souza

Instituição a que pertence o Pesquisador Responsável: Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ)

Telefone para contato: (21) 970457297

INFORMAÇÕES SOBRE O PROJETO

Dando continuidade ao relato de caso publicado referente à redução da concentração dos espermatozoides em paciente em uso de liraglutida, e na tentativa de entender melhor o papel da liraglutida sobre a fisiologia do espermatozoide, o objetivo desse estudo é avaliar se a incubação de espermatozoides in vitro com Liraglutide tem efeitos sobre a motilidade e vitalidade espermáticas.

Para tal, ao final do espermograma, os espermatozoides serão incubados com Liraglutida para verificar sua ação sobre os espermatozoides. Após avaliação, a amostra contendo espermatozoides e Liraglutida será descartada.

Riscos: Este projeto não oferece qualquer tipo de risco ao paciente, visto que o material a ser utilizado no estudo é o descarte do sêmen que foi usado para a realização do exame ou do procedimento de fertilização.

Benefícios: Este estudo pode beneficiar os pacientes que buscam tratamento de infertilidade conjugal, trazendo melhora durante a investigação da infertilidade masculina, a interpretação dos resultados dos exames e os diagnósticos dos pacientes. Como consequência, estes benefícios contribuem também para a melhora na conduta dos profissionais especializados e no tratamento de reprodução assistida, uma vez que novas ferramentas diagnósticas e novas intervenções podem ser utilizadas.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Projeto de Pesquisa: “O PAPEL DA LEPTINA E DO LIRAGLUTIDA NA FUNÇÃO ESPERMÁTICA”

Pesquisador Responsável: Cristiane da Fonte Ramos

Doutoranda: Paula Fontoura Coelho de Souza

Instituição a que pertence o Pesquisador Responsável: Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ)

Telefone para contato: (21) 970457297

Código _____

Eu, _____, fui devidamente informado e esclarecido sobre o projeto de pesquisa acima do qual me disponho fazer parte, como voluntário.

Estou ciente de que não terei direito a nenhuma remuneração, já que minha participação no projeto é voluntária e sem interesse financeiro.

Estou ciente da confidencialidade das informações geradas e de que a pesquisa trabalha com o anonimato. Também estou ciente de que esta pesquisa poderá ser publicada, assegurando-se a confidencialidade dos indivíduos nela envolvidos.

Autorizo submeter a amostra de sêmen coletada à avaliação, sabendo que esta amostra será apenas o material que restar após a realização do exame.

A qualquer momento, terei o direito de conhecer os resultados da pesquisa, assim como, terei o direito de me retirar do projeto em qualquer fase da pesquisa, se assim o desejar.

Rio de Janeiro, _____ de _____ de 20____.

(Assinatura do Paciente)

(Assinatura do Pesquisador)

APÊNDICE E – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Leptina)**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

Projeto de Pesquisa: “O PAPEL DA LEPTINA E DO LIRAGLUTIDA NA FUNÇÃO ESPERMÁTICA”

Pesquisador Responsável: Cristiane da Fonte Ramos

Doutoranda: Paula Fontoura Coelho de Souza

Instituição a que pertence o Pesquisador Responsável: Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ)

Telefone para contato: (21) 970457297

INFORMAÇÕES SOBRE O PROJETO

A leptina é um hormônio que tem funções na regulação do sistema reprodutor masculino. Estudos já demonstraram que o receptor da leptina está presente em espermatozoides. O objetivo desse estudo é avaliar se a incubação de espermatozoides in vitro com leptina pode melhorar a qualidade dos espermatozoides.

Para tal, ao final do espermograma, os espermatozoides serão incubados com leptina para verificar sua ação sobre os espermatozoides, analisando sua motilidade, vitalidade, taxa de fragmentação do DNA espermático e parâmetros de estresse oxidativo. Após avaliação, a amostra contendo espermatozoides e leptina será descartada.

Riscos: Este projeto não oferece qualquer tipo de risco ao paciente, visto que o material a ser utilizado no estudo é o descarte do sêmen que foi usado para a realização do exame ou do procedimento de fertilização.

Benefícios: Este estudo pode beneficiar os pacientes que buscam tratamento de infertilidade conjugal, trazendo melhora durante a investigação da infertilidade masculina, a interpretação dos resultados dos exames e os diagnósticos dos pacientes. Como consequência, estes benefícios contribuem também para a melhora na conduta dos profissionais especializados e no tratamento de reprodução assistida, uma vez que novas ferramentas diagnósticas e novas intervenções podem ser utilizadas.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Projeto de Pesquisa: “O PAPEL DA LEPTINA E DO LIRAGLUTIDA NA FUNÇÃO ESPERMÁTICA”

Pesquisador Responsável: Cristiane da Fonte Ramos

Doutoranda: Paula Fontoura Coelho de Souza

Instituição a que pertence o Pesquisador Responsável: Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ)

Telefone para contato: (21) 970457297

Código _____

Eu, _____, fui devidamente informado e esclarecido sobre o projeto de pesquisa acima do qual me disponho fazer parte, como voluntário.

Estou ciente de que não terei direito a nenhuma remuneração, já que minha participação no projeto é voluntária e sem interesse financeiro.

Estou ciente da confidencialidade das informações geradas e de que a pesquisa trabalha com o anonimato. Também estou ciente de que esta pesquisa poderá ser publicada, assegurando-se a confidencialidade dos indivíduos nela envolvidos.

Autorizo submeter a amostra de sêmen coletada à avaliação, sabendo que esta amostra será apenas o material que restar após a realização do exame.

A qualquer momento, terei o direito de conhecer os resultados da pesquisa, assim como, terei o direito de me retirar do projeto em qualquer fase da pesquisa, se assim o desejar.

Rio de Janeiro, _____ de _____ de 20____.

(Assinatura do Paciente)

(Assinatura do Pesquisador)

APÊNDICE F – Questionário de coleta

QUESTIONARIO PARA COLETA DO SEMEN

Informações gerais:

Nome: _____ Data: ___ / ___ / ___

Médico solicitante: _____

Data da última ejaculação: ___ / ___

Período: () manhã () tarde () noite

Peso _____ Altura _____ Idade: _____

Diagnóstico de varicocele ou hidrocele? () Não () Sim () Testículo direito () Testículo esquerdo

Foi feita varicocelectomia? () Não () Sim Quando? _____

Trauma/lesão testicular? () Não () Sim Quando? _____

Criptorquidia? () Não () Sim Quando? _____

Infecção no trato urogenital? () Não () Sim Quando? Quais? _____

Diagnóstico de diabetes? () Não () Sim Qual(is)? _____

Diagnóstico de doenças cardiovasculares? () Não () Sim Qual(is)? _____

Teve contágio com víruses (hepatite B, hepatite C, HIV, HTLV)? () Não () Sim Qual(is)? _____

Está em uso de vitaminas? () Não () Sim Qual(is)? _____

Faz uso contínuo de algum medicamento? () Não () Sim Qual(is)? _____

Usou algum medicamento nas últimas 24 horas? () Não () Sim Qual(is)? _____

Faz uso diário de álcool? () Não () Sim Qual? _____

Bebeu nas últimas 24 horas? () Não () Sim Qual? _____ Dose: _____

Fuma? () Não () Sim Quantos cigarros por dia? _____

Faz uso de alguma droga entorpecente? () Não () Sim Qual(is)? _____

Já fez exame do sêmen anteriormente? () Não () Sim e foi normal () Sim e foi alterado

Informações sobre esta coleta

Houve perda na hora da coleta? () Não () Início: ___ gotas () Final: ___ gotas

Houve contaminação com algum material? () Não () Sim Qual? _____

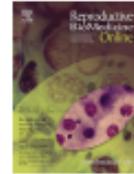
ESTAS INFORMAÇÕES SERÃO TRATADAS DE FORMA ABSOLUTAMENTE IMPESSOAL E RIGOROSAMENTE CONFIDENCIAIS

ANEXO A – Artigo do relato de caso do Liraglutida

Reproductive BioMedicine Online (2014) 29, 644-646



www.sciencedirect.com
www.rbmonline.com



SHORT COMMUNICATION

The effects of liraglutide on male fertility: a case report



Paula Fontoura ^a, Maria Cecilia de Almeida Cardoso ^b,
Maria Cecilia Erthal-Martins ^b, Caio Werneck ^b, Cassio Sartorio ^b,
Cristiane Fonte Ramos ^{a,*}

^a Department of Anatomy, State University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro 20551-030, Brazil; ^b Vida Centro de Fertilidade Clínica, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro 22793-080, Brazil

* Corresponding author. E-mail address: cristiane@pesquisador.cnpq.br (CF Ramos).



Paula Fontoura got a biology degree from the State University of Rio de Janeiro in 2008. In 2009 she developed a specialization thesis on the "Relationship between oxidative stress, sperm DNA fragmentation and male fertility" at Sapientiae Institut of Fertility Clinic, Sao Paulo, Brazil. She continued her research career by getting a Master degree in Science from the State University of Rio de Janeiro in December 2011. After that she began a PhD project on the "Correlation between sperm quality and IVF success: leptin's role on sperm function", a collaboration between the State University of Rio de Janeiro and the clinic VIDA, Fertility Center in Rio de Janeiro, Brazil.

Abstract Liraglutide is an agonist of the glucagon-like peptide 1 receptor, and is commonly recommended as a treatment for obesity and type 2 diabetes mellitus. Adverse effects related to liraglutide include acute pancreatitis and polyarthrititis. No studies, however, have reported an adverse effect of liraglutide on male reproduction. This case report shows a deleterious effect of liraglutide on male reproductive function.

© 2014 Reproductive Healthcare Ltd. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

KEYWORDS: liraglutide, male infertility, male reproduction, spermatozoa

Introduction

Liraglutide is an agonist of glucagon-like peptide 1 (GLP-1), and is commonly recommended for the treatment of obesity and type 2 diabetes mellitus. Glucose-induced insulin secretion is stimulated by GLP-1 agonists, which inhibits glucagon secretion, reduces gastrointestinal motility, and in turn reduces appetite and food intake, leading to weight loss (Ishay et al., 2013; Marathe et al., 2013). Adverse effects of liraglutide treatment include acute pancreatitis (Famularo et al., 2012;

Knezevich et al., 2012) and polyarthrititis (Ambrosio et al., 2013). This is a case report showing an adverse effect of liraglutide on male fertility.

Case report

A 35-year-old man experiencing primary and idiopathic infertility for one year presented to the clinic in November 2011. He had no previous family history of infertility and was seeking

<http://dx.doi.org/10.1016/j.rbmo.2014.07.009>

1472-6483/© 2014 Reproductive Healthcare Ltd. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

Table 1 Patient's spermogram values.

Date	Semen volume (ml)	Sperm concentration ($\times 10^6$ /ml)	Sperm motility (% A+B)	Sperm morphology (%)	Leucocyte concentration ($\times 10^6$ /ml)
November 2011	2.5	51.6	55.6	8	0.8
March 2012	3.0	0.2	0.0	-	-
March 2012	1.1	0.0	0.0	-	-
May 2012	3.0	0.01	0.0	-	0.6
July 2012	2.7	8.7	48.1	2.5	0.1
August 2012	3.2	28	32.1	-	-
Reference values*	≥ 1.5	≥ 15	≥ 32	≥ 4	≤ 1.0

Dash means not evaluated.

*Reference values according to World Health Organization, 2010.

infertility treatment for the first time. He previously had surgery for myopia correction. He reported social drinking, physical activity twice a week and normal sexual function; his scrotal Doppler ultrasound was normal. His wife was also investigated and presented a normal blood screening and hormonal levels, no infectious serologies and no alterations in pelvic ultrasound screening, hysterosalpingography and hysteroscopy examinations. The patient's first spermogram was carried out in November 2011, and showed normal parameters of semen volume, sperm concentration, motility, morphology and leucocyte count according to the sperm classification established by the World Health Organization (World Health Organization, 2010). The patient returned 4 months later for an intrauterine insemination. The semen analysis showed a 0.2×10^6 sperm/ml concentration and no sperm motility (100% type D spermatozoa) (Table 1). To confirm this result, the sperm collection was repeated after 6 h, and no spermatozoa were found, and the clinic doctors cancelled the intrauterine insemination procedure. At this time, the patient reported that he was taking a 0.6 mg dose of liraglutide, and that this was the only medication he was taking. He reported no changes in his lifestyle, nor any flu or fever. He also reported that he had no history of infertility in his family, and that the only family history of disease he had was his father's obesity. He began taking liraglutide in October 2011 (1 month before the first and normal sperm analysis) because of a slight increase in his glucose levels and his high weight (100 kg). Because liraglutide was the only medication he was using at that time, the patient was advised to make an appointment with his doctor to consider the possibility of interrupting the drug treatment. The patient used liraglutide for 5 months and lost 2 kg during this period.

Two months after the medication was interrupted, a new spermogram was carried out for the patient. The results showed normal semen volume, normal leucocyte concentration, a sperm concentration of 0.01×10^6 sperm/ml, and no sperm motility (100% type D spermatozoa). The sperm morphology could not be assessed owing to the low sperm concentration. Two months later (4 months after liraglutide interruption), a new spermogram showed normal volume, normal leucocyte concentration, an 8.7×10^6 sperm/ml concentration, normal motility and 2.5% normal morphology (Table 1). Although the motility was recovered and the sperm production was increased, the sperm concentration was not normal. This sample was frozen as a precaution, and the couple

started an IVF treatment. One month later (5 months after liraglutide interruption), on the day of the oocyte retrieval, the semen analysis showed normal values for all parameters (Table 1). Therefore, the doctors decided to use this fresh sample for oocyte fertilization. Of the four oocytes retrieved, three were mature, and were used for the intracytoplasmic sperm injection (ICSI) procedure, resulting in 100% fertilization. Two class A embryos (according to the ASEBIR classification, (ASEBIR, 2008)) were transferred on day 2 of embryo development, and the remaining embryo was vitrified at the blastocyst stage. The couple had a successful pregnancy and gave birth to twins after 36 weeks. This study had the patient's written consent.

Discussion

Liraglutide has been shown to have adverse effects, such as acute pancreatitis (Famularo et al., 2012; Knezevich et al., 2012) and polyarthritis (Ambrosio et al., 2013). In this case report, liraglutide use was found to cause interrupted sperm production, which was completely restored after 5 months of liraglutide interruption. Because spermatogenesis is a continuous process and germ cells take 72 days to complete their maturation, it would take approximately this time to recover normal sperm production after a complete halt of spermatogenesis. Unfortunately, the patient had a new sperm evaluation only 4 months after drug interruption. At this time, his spermogram showed normal sperm motility and a sperm concentration of 8.7×10^6 sperm/ml. One month later, the patient had all normal sperm parameters. The US Food and Drug Administration (FDA communication, unpublished data <http://www.ehealthme.com/ds/victoza/sperm-count-decreased> accessed date: november 15, 2013) reported that, among 11,308 people with different adverse side-effects taking liraglutide, two of them reported having a decreased sperm count. It was not clear, however, how many patients were tested for fertility, the amount of time of drug treatment, or the values of the sperm parameters before and after liraglutide treatment.

Although the laboratory policy is to carry out one-half conventional IVF and one-half ICSI in the oocytes, it was decided that all the oocytes should be injected by ICSI for several reasons. First, there was a risk of total fertilization failure, because the patient's wife was 28 years old and showed a poor

ovarian response; furthermore, it was not known whether the medication would have an effect on sperm function. The patient did not exhibit any other adverse effects that have been previously described in the literature.

The first evidence for a role of GLP-1 in reproduction came from knockout mice. Pubertal delay occurred in female GLP-1 receptor knockout mice and reduced gonadal weight occurred in male GLP-1 receptor knockout mice had reduced gonadal weight despite normal steroid hormone levels in both sexes (MacLusky et al., 2000). In men, GLP-1 infusion reduced the frequency of testosterone pulses, suggesting an inhibitory effect on testosterone secretion that is independent of changes in LH levels (Jeibmann et al., 2005). In healthy men, 6-h GLP-1 infusion resulted in no change in LH levels or LH pulse frequency and amplitude (Jeibmann et al., 2005). Frequency of testosterone pulses in the 6-h time course in men is also reduced by GLP-1 infusion (Jeibmann et al., 2005).

Furthermore, the relationship between GLP-1 and male reproduction still needs to be clarified. The current data on GLP-1 and reproduction are scarce and controversial. No clear mechanism by which liraglutide affects the reproductive system can be provided. As this is a case report, it was not possible to carry out additional analyses. Therefore, it is not possible to indicate the potential effect of liraglutide on spermatogenesis. The only thing we can assume is that the drug influences the reproductive system, which leads to an arrest in spermatogenesis, probably by affecting the hormones and factors that regulate the gonads, such as gonadotropins, leptin, insulin and others. To our knowledge, this is the first report of a detailed case of adverse effects on male reproduction associated with liraglutide use. Further experimental studies should be conducted to clarify the mechanism of liraglutide's effects on the male reproductive system. Caution should be taken with liraglutide treatment in male partners of couples who are attempting to become pregnant.

Acknowledgements

This study was supported by FAPERJ (Foundation of Research's Support of Rio de Janeiro) Rio de Janeiro, Brazil and

CNPQ (National Counsel of Technological and Scientific Development) Federal District, Brazil.

References

- Ambrosio, M.L., Monami, M., Satti, L., Marchionni, N., Di Bari, M., Mannucci, E., 2013. GLP-1 receptor agonist-induced polyarthritides: a case report. *Acta Diabetol.* 51, 673-674.
- ASEBIR, 2008. Cuadernos de Embriología Clínica. II. Criterios ASEBIR de Varloación Morfológica de Oocitos, Embriões Tempranos y Blastocistos Humanos, 2ª ed.
- Famularo, G., Gasbarrone, L., Mintsola, G., 2012. Pancreatitis during treatment with liraglutide. *JOP (Online)* 13, 540-541.
- Ishay, P.L., Knop, F.K., Vilisball, T., Glenthoj, B.Y., Ebdrup, B.H., 2013. Sustained weight loss after treatment with a glucagon-like peptide-1 receptor agonist in an obese patient with schizophrenia and type 2 diabetes. *Am. J. Psychiatry* 170, 681-682.
- Jeibmann, A., Zahedi, S., Simoni, M., Nieschlag, E., Byrne, M.M., 2005. Glucagon-like peptide-1 reduces the pulsatile component of testosterone secretion in healthy males. *Eur. J. Clin. Invest.* 35, 565-572.
- Knezevich, E., Cmic, T., Kershaw, S., Drincic, A., 2012. Liraglutide-associated acute pancreatitis. *Am. J. Health Syst. Pharm.* 69, 386-389.
- MacLusky, N.J., Cook, S., Scrocchi, L., Shin, J., Kim, J., Vaccarino, F., Asa, S.L., Drucker, D.J., 2000. Neuroendocrine function and response to stress in mice with complete disruption of glucagon-like peptide-1 receptor signalling. *Endocrinology* 141, 752-762.
- Marathe, C.S., Rayner, C.K., Jones, K.L., Horowitz, M., 2013. Glucagon-like peptides 1 and 2 in health and disease: a review. *Peptides* 44, 75-86.
- World Health Organization, 2010. WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen, fifth ed. Cambridge University Press, Cambridge.

Declaration: The authors report no financial or commercial conflicts of interest.

Received 30 January 2014; refereed 1 July 2014; accepted 2 July 2014.

ANEXO B – Artigo dos resultados experimentais com leptina

07/06/2016

Gmail - Acknowledgement of Submission (#JRI-1604-1003)



Paula Fontoura <paulinha.biouerj@gmail.com>

Acknowledgement of Submission (#JRI-1604-1003)

2 mensagens

Journal of Reproduction & Infertility <journal@avicenna.ac.ir>
 Para: paulinha.biouerj@gmail.com, paulinha-74@hotmail.com

9 de abril de 2016 12:30

Manuscript ID: JRI-1604-1003

Manuscript Title: **LEPTIN IMPROVES SPERM CRYOPRESERVATION VIA ANTIOXIDANT DEFENSE**

Authors: Paula Fontoura, Mariana Duque Mello, Paulo Gallo-Sá, Maria Cecília Erthal-Martins, Maria Cecília Almeida Cardoso, Cristiane Ramos

Dear Dr **Paula Fontoura**

Please be informed that the mentioned manuscript has been submitted to the Journal of Reproduction and Infertility (JRI) by your colleagues. We would like to welcome your interest in submitting the manuscript.

It will be evaluated by the journal's Associate Editors initially and will be sent for peer reviewers if the manuscript is approved for further evaluation.

Correspond Author Name: **Dr. Cristiane da Fonte Ramos**

Best Regards,

Journal Editorial Office

6/14/2016

Gmail - Acknowledgement of Submission (#JRI-1604-1003)



Paula Fontoura <paulinha.biouerj@gmail.com>

Acknowledgement of Submission (#JRI-1604-1003)

Journal of Reproduction & Infertility <journal@avicenna.ac.ir>
 Para: Paula Fontoura <paulinha.biouerj@gmail.com>

11 de junho de 2016 08:21

Dear Dr Paula Fontoura,

Thank you very much for your follow up.

Please be informed that your manuscript has been reviewed by one expert and one of the journal's associate editor. We are waiting to receive new comments from the other expert. After that, you will be aware about next decision.

Best Regards

Journal Editorial Office

From: Paula Fontoura [mailto:paulinha.biouerj@gmail.com]
Sent: Tuesday, June 07, 2016 8:53 PM
To: Journal of Reproduction & Infertility
Subject: Re: Acknowledgement of Submission (#JRI-1604-1003)

[isto são mensagens anteriores ocultas]

ANEXO C – Artigo submetido dos resultados experimentais com Liraglutida

6/14/2016

ScholarOne Manuscripts

 Andrology

Submission Confirmation

 Print

 Thank you for your submission

Submitted to

Andrology

Manuscript ID

ANDR-2016-0256

Title

GLP-1 receptor is present on human spermatozoa and mouse testis

Authors

Fontoura, Paula

Mello, Mariana

de Bem, Grazielle

Barreto-Vianna, André

Gallo-Sá, Paulo

Erthal-Martins, Maria Cecília

Cardoso, Maria Cecília

Ramos, Cristiane

Date Submitted

14-Jun-2016

[Author Dashboard](#)

 © Thomson Reuters | © ScholarOne, Inc., 2015. All Rights Reserved.

ScholarOne Manuscripts and ScholarOne are registered trademarks of ScholarOne, Inc.

ScholarOne Manuscripts Patents #7,257,767 and #7,263,655.

[@ScholarOneNews](#) | [System Requirements](#) | [Privacy Statement](#) | [Terms of Use](#)