

FERNANDA ALVES MAIA

**AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS SEMINAIS DE INDIVÍDUOS INFÉRTEIS EM
USO DE POLIVITAMÍNICO E POLIMINERAL**

Dissertação apresentada ao Departamento de Ginecologia e Obstetrícia e Mastologia da Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof^a Dr^a Anaglória Pontes

BOTUCATU - SP

2009

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO
DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: Selma Maria de Jesus

Maia Fernanda Alves.

Avaliação dos parâmetros seminais de indivíduos inférteis em uso de polivitamínico e polimineral / Fernanda Alves Maia. – Botucatu : [s.n.], 2009

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina de Botucatu, 2009.

Orientadora: Anaglória Pontes

Assunto CAPES: 40300005

1. Infertilidade masculina 2. Sêmen 3. Parâmetros seminais

CDD 618.178

Palavras-chave: Infertilidade masculina; Parâmetros seminais; Polimineral; Polivitamínico

Dedicatória

Dedico este mestrado ao meu Paizinho, Dja (in memoriam) Que me deixou a maior e melhor herança que um pai pode dar ao filho OS ESTUDOS

E a minha mãezinha, Ana que sempre esteve ao lado dele ajudando-o nesta caminhada e me apoiando para seguir em frente e realizar todos os meus sonhos. Amo vocês!

A Victor, amor e companheiro que sempre estava ao meu lado quando precisava, me dando forças e com certeza se não fosse a sua ajuda nunca teria chegado aqui. Te amo muito!

Ao Gabriel, meu bebê, que com certeza foi um grande presente de Deus. Graças a este projeto pude perceber que engravidar não era tão fácil e mudar os meus planos. Obrigado filho pelo seu sorriso constante e encanto diário.

Aos meus sogros que me acolheram em um dos momentos mais difíceis da minha vida, especialmente a Angelina que foi como uma mãe e meu deu muita força para eu não desistir dessa caminhada. Muito Obrigada!

E a todos os meus familiares, irmãos, cunhados, sobrinhos que de uma forma ou de outra me ajudaram.

Agradecimentos Especiais

A Deus que sempre me mostrou o caminho da luz...

À Dr^a Anaglória Pontes, por ter confiado no meu trabalho e ter me dado à oportunidade de realizar esta conquista, compartilhando comigo o seu conhecimento. Por toda sua paciência e compreensão e que quando tudo parecia ir errado sempre me dava uma palavra de conforto, carinho e incentivo. Meu MUITÍSSIMO Obrigada!

À equipe do Laboratório de Reprodução Humana Assistida, em especial à Eliana Milanesi Rúbio e à Gisela Alessandra Daroz sem os quais este projeto não seria possível. Obrigada!

Aos casais que participaram deste projeto a realização deste estudo só possível com a participação indireta de vocês.

Agradecimentos

Agradeço a todos que contribuíram para a realização deste trabalho, em especial:

Aos funcionários da Pós-graduação em especial à Ana Cláudia Garcia Mira e à Sandra Aparecida de Carvalho, por estarem prestes a resolver os problemas da melhor forma possível.

Ao grupo de apoio à pesquisa (GAP), principalmente à Juliana Cristina Interdonato, pelo seu profissionalismo e dedicação.

À equipe médica em especial à Anice Maria Vieira de Camargos Martins e a Ana Gabriela Pontes Santos pela ajuda na avaliação dos prontuários.

As bibliotecárias Nivaldete Costa Fernandes Cruz, pelos inúmeros favores, inestimável ajuda e carinho e Selma Maria de Jesus pela confecção da ficha catológica.

À professora Lídia Raquel de Carvalho, pela análise estatística dos dados obtidos.

À toda equipe do Prontuário Médico, em especial à Sônia Maria Victorati Garcia, que sempre foi solidária na busca dos prontuários.

À banca do Exame Geral de Qualificação, pelas oportunas sugestões.

“Cada um que passa em nossa vida passa sozinho, mas não vi só, nem nos deixa só. Leva um pouco de nós mesmos, deixa um pouco de si mesmo.”

Antonie Saint Exupéry.

Resumo

A infertilidade é definida pela inabilidade de engravidar após 12 meses ou mais de coito regular não protegido. O uso de polivitamínico e polimineral parece influenciar na qualidade seminal. Dados da literatura sobre o uso oral isolado ou combinado desses micronutrientes na melhoria dos parâmetros seminais e eventual fertilidade são controversos e escassos.

Objetivo: Analisar os parâmetros seminais de indivíduos inférteis em uso de polivitamínico e polimineral e compará-los com indivíduos normais, comprovadamente férteis sem uso destas substâncias. **Casuística e Metodologia:** Foram analisados os parâmetros Seminais de 57 casais inférteis acompanhados no ambulatório de esterilidade do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu, no período de 2003 a 2007. Nos indivíduos inférteis a análise seminal foi realizada antes e com 90 dias de micronutrientes por via oral os quais foram comparados com 50 indivíduos saudáveis comprovadamente férteis sem uso destas substâncias. A avaliação do sêmen foi feita de acordo com os critérios da Organização Mundial de Saúde - OMS (1999) e morfologia de Kruger et al. (1986). A análise estatística foi feita utilizando os testes *t de Student*, Mann-Whitney e Wilcoxon, considerando um nível de significância de 5%. **Resultados:** Os indivíduos inférteis e os comprovadamente férteis apresentaram similaridade quanto a idade ($31,0 \pm 5,6$ versus $30,3 \pm 6,5$) ($p=0,55$) e ao tabagismo ($29,8\%$ versus $22,0$) ($p=0,36$). Nos indivíduos inférteis, o uso desses micronutrientes aumentou significativamente a morfologia tanto pelos critérios estabelecidos pela OMS ($18,3 \pm 9,6$ para $22,6 \pm 11,8$) ($p=0,006$) e por Kruger ($6,9 \pm 4,1$ para $9,1 \pm 5,2$) ($p=0,002$). Verificou-se que os homens inférteis antes do uso de micronutrientes quando comparados aos férteis apresentavam significativamente uma menor concentração de espermatozóides/ml ($68,0[37,8;101,2]$ versus $96,5[49,0;144,2]$) e vitalidade ($85,4 \pm 9,2$ versus $89,6 \pm 6,9$) e uma maior contagem de leucócitos ($600,0 [300,0;121,5]$ versus $350,0[100,0;675,0]$). Os parâmetros seminais dos indivíduos inférteis em uso de polivitamínico e polimineral foram comparáveis ao grupo de indivíduos comprovadamente férteis com exceção da concentração ($68,0[28,8;102,5]$ versus $96,5[49,0;144,2]$) e vitalidade ($85,6 \pm 9,1$ versus $89,6 \pm 6,9$) de espermatozóides que foram significativamente inferiores. **Conclusão:** Nos indivíduos inférteis analisadas o uso combinado de ácido fólico, β -caroteno, α -tocoferol, ácido ascórbico, selênio, cobre e zinco aumenta significativamente a porcentagem de espermatozóides morfolologicamente normais sem melhora estatística significativa de outros parâmetros seminais como concentração, motilidade e vitalidade quando comparados com os indivíduos saudáveis comprovadamente férteis.

Palavras-chave: Parâmetros seminais. Infertilidade masculina. Polivitamínico. Polimineral.

Abstract

Infertility is defined as the inability to become pregnant after 12 months or more of regular unprotected intercourse. The use of multivitamin/multimineral supplements seems to influence semen quality. Data on the isolated or combined use of these micronutrients to improve semen parameters and eventual fertility are controversial and scarce. **Objective:** To assess semen parameters in infertile individuals using multivitamin and multimineral supplements in comparison with healthy proven fertile individuals not using these substances. **Cases and Methods:** Semen parameters were evaluated in 57 infertile couples followed up in the Sterility Outpatient Clinic of Botucatu Medical School between 2003 and 2007. Semen analysis was performed before and after 90 days of oral micronutrient use in infertile individuals that were compared with 50 healthy proven fertile individuals not using these substances. Semen was evaluated according to the recommendations of the World Health Organization- WHO (1999) and the criteria described by Kruger et al. (1986). Statistical analysis was carried out using Student's *t* test and the tests of Mann-Whitney and Wilcoxon with significance set at 5%. **Results:** Infertile and proven fertile individuals showed similar age (31.0 ± 5.6 versus 30.3 ± 6.5) ($p=0.55$) and smoking status (29.8% versus 22.0) ($p=0.36$). In infertile individuals, the use of micronutrients significantly improved morphology according to the criteria of WHO (18.3 ± 9.6 to 22.6 ± 11.8) ($p=0.006$) and Kruger (6.9 ± 4.1 to 9.1 ± 5.2) ($p=0.002$). Before micronutrient use, infertile individuals compared with fertile males showed lower spermatozoa/ml concentration ($68.0[37.8;101.2]$ versus $96.5[49.0;144.2]$) and vitality (85.4 ± 9.2 versus 89.6 ± 6.9) and higher leukocyte count ($600.0 [300.0;121.5]$ versus $350.0[100.0;675.0]$). In infertile individuals using multivitamin and multimineral supplements, semen parameters were comparable to those in proven fertile individuals, except for spermatozoa concentration ($68.0[28.8;102.5]$ versus $96.5[49.0;144.2]$) and vitality (85.6 ± 9.1 versus 89.6 ± 6.9), which were significantly lower. **Conclusion:** In the infertile individuals assessed, the combined use of folic acid, β -carotene, α -tocopherol, ascorbic acid, selenium, copper and zinc significantly increased the percentage of morphologically normal spermatozoa without significantly increasing other semen parameters such as concentration, motility and vitality as compared with healthy proven fertile individuals.

Key words: Semen parameters. Male Infertility. Multivitamin. Multimineral.

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Valores de normalidade e nomenclatura da análise seminal.....	28
Tabela 2 - Características dos homens inférteis e dos	33
Tabela 3 - Parâmetros seminais de indivíduos inférteis antes e em uso de polivitamínico e polimineral e férteis	33
Tabela 4 - Comparação dos parâmetros seminais de homens inférteis antes do uso, durante o uso de polivitamínico e polimineral por 90 dias e dos férteis sem uso destas substâncias	33

Sumário

1 INTRODUÇÃO.....	17
2 OBJETIVO	23
3 CASUÍSTICA E MÉTODO	Erro! Indicador não definido.
3.1 Análise Estatística	31
4 RESULTADOS	32
5 DISCUSSÃO	33
6 CONCLUSÃO.....	42
REFERÊNCIAS	44
ANEXOS.....	51
Trabalho a ser enviado para publicação com as normas da Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia.....	58

1. Introdução

A infertilidade é doença definida pela inabilidade de um casal sexualmente ativo engravidar após 12 meses ou mais de coito regular não protegido (AMERICAN SOCIETY FOR REPRODUCTIVE MEDICINE, 2008; WHO, 1999). Aproximadamente 14% dos casais são inférteis (WONG et al., 2000) e, em 50% dos casos, o fator masculino está envolvido como problema primário ou em combinação com causa de origem feminina (NALLELLA et al., 2006). A fertilidade é um fenômeno complexo e multifatorial que envolve a avaliação do casal (PASQUALOTTO; PASQUALOTTO, 2006a).

As causas de infertilidade masculina podem ser decorrentes de: fatores genéticos, como alterações cromossômicas, microdeleções no cromossomo Y e mutações gênicas; uso de drogas lícitas e ilícitas; infecções genitais; doenças auto-imunes; varicocele; infecção na glândula acessória masculina; doença testicular adquirida; câncer do testículo (COMHAIRE; MAHMOUD, 2003) e estresse oxidativo (AGARWAL et al., 2008; TREMELLEN, 2008).

Tradicionalmente, o diagnóstico de infertilidade masculina depende de uma avaliação dos parâmetros seminais, com ênfase na concentração, motilidade e morfologia dos espermatozoides (WHO, 1999). Embora não seja, isoladamente, considerada fundamental para diagnosticar infertilidade (GUZICK et al., 2001) os resultados da análise seminal é conduzida como parte da avaliação inicial dos casais inférteis (NICE, 2004).

A análise seminal pode fornecer dados sobre a espermatogênese (PASQUALOTTO; PASQUALOTTO, 2006a) que consiste em três estágios: proliferação das espermatogônias para originar espermátocitos diplóides; divisão meiótica originando espermátides haplóides; citodiferenciação de espermátide em espermatozoides (MISELL et al., 2006). Além disso, os espermatozoides passam por um período de maturação no epidídimo, que varia de 64 dias (MISELL et al., 2006) a 72 dias (BUSCH et al. 2004).

O sêmen é um líquido biológico formado por plasma seminal, que contém produtos bioquímicos essenciais para os espermatozoides (MURARO et al., 2007), como os antioxidantes (AGARWAL et al., 2008; TREMELLEN, 2008). E por diferentes células, tais como, espermatozoide maduro e imaturo, células redondas em diferentes estágios da espermatogênese, leucócitos e células epiteliais (AGARWAL et al., 2008). Destes diferentes tipos de células os leucócitos e os espermatozoides são as principais fontes de produção de espécies reativas de oxigênio - EROs, como por exemplo, íons de oxigênio, radicais livres e peróxidos (TREMELLEN, 2008). A produção de EROs pelos espermatozoides correlaciona inversamente com seu estado maduro e os espermatozoides imaturos são frequentemente caracterizados pela presença de excesso de resíduos citoplasmáticos (TREMELLEN, 2008). Os quais explicam a baixa qualidade de espermatozoides e a geração crescente de EROs (PASQUALOTTO et al., 2000; NALLELLA et al., 2005; AGARWAL et al., 2008). Essas

estruturas, que são resultados da espermatogênese defeituosa, são os maiores geradores de EROs (AGARWAL et al., 2008).

O estresse oxidativo ocorre quando a produção de EROs supera os mecanismos de defesa antioxidante provocando danos celulares (TREMELLEN, 2008). Níveis altos de EROs com baixos níveis de capacidade antioxidante sugerem uma relação entre estresse oxidativo e infertilidade masculina (PASQUALOTTO et al., 2000). Todos os componentes celulares incluindo lipídeos, proteínas, ácidos nucleicos e açúcares são alvos potenciais do estresse oxidativo. Os lipídeos são as macromoléculas mais susceptíveis e estão presentes na membrana plasmática dos espermatozóides na forma de ácidos graxos poliinsaturados (AGARWAL et al., 2008). Portanto, as EROs danificam a membrana espermática e reduz a motilidade dos espermatozóides e alteram diretamente o DNA espermático (TREMELLEN, 2008), conseqüentemente, a qualidade seminal tem piora importante com o aumento nos níveis de espécies reativas de oxigênio no sêmen (ALKAN et al., 1997; NALLELLA et al., 2005). Um acréscimo nos níveis de espécies reativas de oxigênio em pacientes inférteis foi encontrado ao se compararem as amostras seminais de homens férteis e de pacientes azoospermicos (PASQUALOTTO et al., 2000). KAO et al. 2008 compararam os parâmetros seminais de 35 homens saudáveis e sem alteração seminal com 43 inférteis e verificaram que a capacidade antioxidante total no plasma seminal e nos espermatozóides foram menor nos homens inférteis. Um significativo aumento na porcentagem de homens com fragmentação de DNA espermático foi observado nos pacientes com baixo nível de Acido Ascórbico Seminal quando comparados com os normais (SONG et al., 2006).

O corpo humano tem desenvolvido algumas estratégias antioxidantes para proteger-se dos danos provocados pelas EROs permitindo o metabolismo oxidativo ocorrer sem danificar as células (TREMELLEN, 2008). O plasma seminal e o espermatozóide em si estão bem dotados de um conjunto de proteção antioxidante (FUJII et al., 2003; GARRIDO et al., 2004), entre elas, enzimas antioxidantes, tais como superóxido dismutase e glutathione peroxidase, além de uma variedade de antioxidantes não enzimáticos, por exemplo, ácido ascórbico, α -tocoferol e vitamina A (AGARWAL et al., 2008).

Os fatores ambientais e o estilo de vida relacionados com a infertilidade são de particular interesse, porque, ao contrário das causas genéticas, podem ser alvos de medidas preventivas ou curativas (EBISCH et al., 2007). Entre estes fatores a nutrição é de fundamental importância, pois está envolvida na síntese de DNA (EBISCH et al., 2007). O DNA é constituído de nucleotídeos que são formados a partir de um fosfato, um açúcar e uma base nitrogenada e para a síntese das bases nitrogenadas são necessários aminoácidos e ácido fólico (BAYNES; DOMINICZAK, 2007). As substâncias envolvidas na formação do DNA

devem ser oriundas da alimentação. Portanto a nutrição é importante para a formação de espermatozóides (EBISCH et al., 2007), já que a autoduplicação de DNA é uma etapa necessária para a divisão celular e principal evento da espermatogênese (WONG et al., 2002). Além disso, os micronutrientes são fontes exógenas de antioxidantes e esses protegem o DNA e outras biomoléculas dos danos oxidativos (EBISCH et al., 2007).

Dentre os micronutrientes envolvidos na qualidade seminal podem-se destacar o ácido fólico, o β -caroteno, o α -tocoferol, o ácido ascórbico, o selênio, o cobre e o zinco.

O folato atua como coenzima em várias reações de transferência de carbono na biossíntese de nucleotídeos essenciais para síntese de DNA, RNA (MAFRA et al., 2007) e produção de proteína (WONG et al., 2002). A síntese de DNA é fundamental na espermatogênese, logo o folato é importante nesse processo (WONG et al., 2002). O ácido fólico, forma sintética do folato, é eficiente na desoxidação dos radicais livres e, assim, pode ser considerado um antioxidante (JOSHI et al., 2001). Apesar de seu caráter solúvel em água, o ácido fólico inibe a peroxidação lipídica, protege a membrana celular e/ou DNA dos danos dos radicais livres (JOSHI et al., 2001).

A vitamina A age como hormônio no núcleo controlando a proliferação e diferenciação celular (YUYAMA et al., 2007), atua na espermatogênese ativando a transição de espermatogônias tipo A para o tipo A₁ (CHUNG; WOLGEMUTH, 2004). Na ligação com o ácido retinóico, os receptores sofrem dimerização e ativação, ligando-se aos elementos responsivos a hormônios no DNA, levando a expressão de genes, como por exemplo, o da testosterona (YUYAMA et al., 2007). Para o retinol agir no núcleo é necessário ligar-se a uma proteína ligadora de retinol (PLR) e para o funcionamento do testículo esta proteína é essencial (YUYAMA et al., 2007). O β -caroteno, forma pró-ativa de vitamina A apresenta atividade antioxidante (YUYAMA et al., 2007).

A vitamina E é o principal antioxidante de membrana celular, capaz de inibir a ação de radicais livres e, dessa forma, prevenir a propagação da peroxidação lipídica na membrana plasmática (COZZOLINO, 2007) como a dos espermatozóides. O tocoferol age de maneira catalítica como um antioxidante na membrana, interagindo não enzimaticamente com o ascorbato na fase aquosa da superfície da membrana retirando radicais livres nos lipídeos e enzimaticamente com a glutathione peroxidase uma enzima selênio dependente (COZZOLINO, 2007).

A vitamina C é um importante antioxidante que neutraliza radicais de hidroxila, superóxido e peróxido de hidrogênio (AGARWAL et al., 2004), previne a peroxidação lipídica, recicla a vitamina E e protege os danos do DNA induzidos pelos radicais de peróxido de hidrogênio (AGARWAL et al., 2008). No plasma seminal de homens férteis, a vitamina C

contribui com 65% da capacidade antioxidante total e a concentração de ascorbato no sêmen (364 $\mu\text{mol/l}$) é 10 vezes maior do que no plasma sanguíneo (40 $\mu\text{mol/l}$) (LEWIS et al., 1997). A concentração de ácido ascórbico no plasma seminal é inversamente proporcional com a atividade das espécies reativas de oxigênio em homens inférteis e a diminuição na ingestão de ácido ascórbico com um aumento de danos oxidativos no sêmen de homens saudáveis (LEWIS et al., 1997).

O papel antioxidante do selênio está relacionado com as enzimas glutathionas peroxidases que são selênio dependentes, dentre elas a glutathiona peroxidase fosfolípido hidroperóxido é de maior interesse, pois atua neutralizando a ação de oxidação provocada na membrana da célula pelos hidroperóxidos de ácidos graxos que são reduzidos e esterificados para fosfolípidios (GONZAGA et al., 2007). A glutathiona peroxidase está localizada nos testículos, próstata, vesícula seminal, ductos deferentes, epidídimo, plasma seminal e no próprio espermatozóide (VERNET et al., 2004). O papel específico do selênio na espermatogênese parece estar relacionado a esta enzima, que é expressa dependendo do desenvolvimento das espermatídes (MAIORINO et al., 1998). A deficiência deste mineral como causa potencial da infertilidade não é facilmente avaliada, pois o selênio testicular não se correlaciona com níveis alimentares e o testículo tende a reter níveis normais de selênio mesmo sob circunstâncias de deficiência moderada (FORESTA et al., 2002).

O cobre tem funções orgânicas específicas por ser constituinte de enzimas como a superóxido dismutase (BAYNES; DOMINICZAK, 2007), enzima antioxidante que inativa o ânion superóxido e o radical peróxido convertendo-o em água e oxigênio (TREMELLEN, 2008). A superóxido dismutase está presente tanto no espermatozóide como no plasma seminal (MENNELLA and JONES, 1980). A qual protege os espermatozoides humanos dos danos peroxidativos Além de que a concentração de cobre no sangue correlacionou-se positivamente com a motilidade espermática (WONG et al. 2001).

O zinco tem ganhado muita atenção nos últimos tempos devido ao impacto nutricional sobre as funções reprodutivas masculinas (WONG et al., 2000). Ele é importante no desenvolvimento normal testicular, na espermatogênese e na motilidade dos espermatozoides (WONG et al., 2000, 2002). É um co-fator essencial para mais de 80 metaloenzimas entre elas a superóxido dismutase (YUYAMA et al., 2007). Exerce papel importante na organização de macromoléculas como DNA e RNA, na síntese protéica, na divisão celular, na estabilidade de biomembranas (WONG et al., 2000), logo atua como antioxidante (YUYAMA et al., 2007). Participa da formação da proteína ligadora de retinol, além de influenciar a conversão do β -caroteno em vitamina A por meio da retinal redutase que é dependente de zinco, portanto a

deficiência de zinco pode ser causa secundária da deficiência de vitamina A (YUYAMA et al., 2007).

Dos micronutrientes relatados acima apenas o selênio e o cobre podem provocar efeitos colaterais. Os principais sintomas de intoxicação aguda por selênio são: graves distúrbios intestinais, síndrome do estresse respiratório, distúrbios neurológicos, infarto do miocárdio e falência renal em uma dose superior a 800 µg/dia (GONZAGA et al., 2007) e por cobre são: queimação epigástrica, sangramento gastrintestinal e diarreia em uma resposta a doses de 6 mg/Cu/L² (PEDROSA et al., 2007). O acúmulo de carotenóides parece não ter efeitos adversos, devido sua baixa absorção (YUYAMA et al., 2007). A vitamina E tem muito pouca toxicidade e ingestão habitual de suplementos de até 720 mg/dia não apresentou efeitos adversos detectáveis (COZZOLINO, 2007). Não há evidência clara de que a vitamina C (BAYNES; DOMINICZAK, 2007) e o ácido fólico (MAFRA et al., 2007) tomados em excesso sejam tóxicos. Em relação ao zinco não foi encontrado na literatura efeitos adversos do uso desse micronutriente.

Vários estudos fornecem evidências de que o uso de micronutrientes pode influenciar a qualidade seminal de homens inférteis. Porém esta relação permanece indefinida, já que há contradições entre os trabalhos publicados. Enquanto alguns autores encontraram melhora apenas na concentração espermática (KODAMA et al., 1997; COMHAIRE et al. 2000; WONG et al. 2002), ou na motilidade (SULEIMAN et al. 1996; SCOTT et al. 1998; KESKES et al. 2003), outros verificaram aumento na concentração e na motilidade (TIKKIWAL et al. 1987; OMU et al. 1998), assim como na motilidade e morfologia dos espermatozóides (VEZINA et al. 1996) de homens inférteis em uso isolado ou combinado de micronutrientes. Além disso, existem trabalhos que não observaram melhora em nenhum dos parâmetros seminais (KESSOPOULOU et al. 1995; MOILANEN e HOVATTA, 1995; IWANIER e ZACHARA, 1995; ROLF et al. 1999).

A significativa redução da atividade dos antioxidantes no plasma seminal de homens inférteis quando comparados com os homens férteis (SONG et al., 2006; KAO et al. 2008) e devido aos resultados controversos e a falta de estudos do uso combinado de ácido fólico, β-caroteno, α-tocoferol, ácido ascórbico, selênio, cobre e zinco relacionados aos parâmetros seminais de homens inférteis na população brasileira, a proposta deste estudo foi verificar se o uso de polivitamínico e polimineral, intervenção de baixa complexidade, melhoraria os parâmetros seminais e eventualmente a fertilidade destes indivíduos.

2. *Objetiva*

Analisar os parâmetros seminais de indivíduos inférteis em uso de polivitamínico e polimineral e compará-los com indivíduos normais, comprovadamente férteis sem uso destas substâncias.

3. Casuística e Método

Foram analisados, retrospectivamente, 57 casais com infertilidade acompanhados no ambulatório de esterilidade do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina/Botucatu - Universidade Estadual Paulista/UNESP no período de 2003 a 2007. Os casais foram encaminhados para a avaliação da infertilidade por ginecologista ou procura espontânea.

Duzentos e cinquenta e seis casais submeteram à avaliação inicial completa para a investigação de infertilidade, incluindo: anamnese; exame físico; análise seminal; dosagem de progesterona na fase lútea média do ciclo menstrual; dosagem do hormônio folículo estimulante no terceiro dia do ciclo menstrual; histerossalpingografia; sorologia para rubéola, hepatite B e C e vírus da imunodeficiência humana. De acordo com o caso clínico foi realizado dosagem de testosterona total, globulina carreadora dos hormônios sexuais, prolactina e ultrassonografia transvaginal.

Dos 256 casais 159 homens apresentaram alteração seminal e foram orientados a tomar um complexo polivitamínico e polimineral. Apenas 57 indivíduos (1 com concentração inferior a 20 milhões de espermatozoides/ml, 3 com motilidade linear abaixo de 50%, 41 com 30% de formas anormais de espermatozoides, 5 com motilidade e morfologia anormais e 7 com alteração nos três parâmetros seminais), fizeram uso correto dos micronutrientes e foram incluídos neste estudo. Na avaliação inicial realizada para a investigação da infertilidade, além da alteração seminal observada em todos os indivíduos, 21% (12/57) dos casais apresentavam anovulação crônica e em 79% (45/57) não foram detectadas outras alterações.

Estes 57 indivíduos, que tinham idade entre 20 e 42 anos, usaram diariamente, por 90 dias consecutivos, um comprimido via oral após a refeição, de ácido fólico (5 mg) (Endofolin®) e um comprimido por via oral de um complexo polivitamínico e polimineral constituído de β -caroteno (pró-vitamina A) 10.000 UI, ácido ascórbico (vitamina C) 600mg, acetato de tocoferol (vitamina E) 200 UI, cobre (óxido de cobre) 1,0 mg, selênio (selênio glicina quelato) 100 mg e zinco (óxido de zinco) 40 mg (Vitergan Zinco Plus®). Estes indivíduos realizaram dois espermogramas, um antes e outro com 90 dias em uso dessas substâncias.

O grupo controle foi composto de 50 homens saudáveis, com idade variando de 20 a 48 anos, sem uso de polivitamínico e polimineral, com fertilidade comprovada e estabelecida com o casal, possuindo filho (a) com até dois anos de idade ou com gestação superior a 28 semanas. Nesses indivíduos foi possível realizar apenas um espermograma. Este grupo foi utilizado para verificar se os parâmetros seminais dos homens inférteis seriam diferentes

(quando estes não estavam em uso) ou semelhantes (quando estes estavam em uso de micronutrientes) aos dos homens férteis.

Os critérios de exclusão para ambos os grupos foram: homens com idade superior a 50 anos, concentração igual ou inferior a cinco milhões de espermatozoides/ml, febre ou uso de medicamentos e/ou doenças nos últimos três meses que interferissem nos parâmetros seminais e uso de drogas ilícitas. Os homens em uso do complexo polivitamínico e polimineral que apresentaram epigastralgia, único efeito colateral observado, também foram excluídos deste estudo.

Após esclarecimentos, os integrantes do estudo assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, conforme resolução nº 196/outubro/1996 – Conselho Nacional de Saúde e segundo as normas do Comitê de Ética e Pesquisa (Anexos A e B). O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual Paulista – Faculdade de Medicina de Botucatu, ofício 383/2006 – CEP (Anexo C).

Para avaliação dos participantes foi realizado um questionário, no momento da coleta seminal, para obter informações gerais de identificação, saúde, história sexual, situação ocupacional e números de filhos e uso adequado dos medicamentos (Anexo D). Foi feita também uma análise dos prontuários dos casais inférteis para avaliar tempo e causa da infertilidade, e se fizeram de forma adequada o uso de polivitamínico e polimineral.

As amostras seminais dos indivíduos foram obtidas seguindo as orientações para a coleta do sêmen padronizado pelo Laboratório de Reprodução Humana do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu (Anexo E) e as análises seminais foram realizadas por uma mesma equipe deste laboratório. Os parâmetros seminais foram analisados e classificados segundo os critérios de normalidade da Organização Mundial de Saúde (WHO, 1999), com adicional morfologia pelo critério de Kruger et al. (1986), conforme a tabela 1, a seguir.

Tabela 1 - Valores de normalidade e nomenclatura da análise seminal

Variáveis e Nomenclatura Seminal	Valores de Normalidade
Volume	2,0, a 5,0 ml
Liquefação	30 a 50 minutos
Aspecto	Homogêneo
pH	7,2 a 8,0
Viscosidade	Normal – gotas Anormal - filamentos de até 2 cm
Coloração	Opalescente acinzentada
Concentração espermática	$\geq 20 \times 10^6$ spzt/ml A – spzt com progressão linear rápida B – spzt com progressão linear lenta C – spzt com movimentos de batimentos ou circulares, porém sem progressão. D – spzt imóvel Normal - > 50% A+B e 25% A Anormal - < 50% de A+B
Motilidade	
Vitalidade	$\geq 50\%$ de spzt vivos
Leucócitos	$< 1 \times 10^6$ /ml (< 1.000.000/ml - normal)
Leucócitos teste peroxidase	$< 5 \times 10^5$ /ml (< 500.000/ml - normal)
Teste hiposmótico	> 60%
Morfologia (WHO, 1992)	$\geq 30\%$ de formas normais
Morfologia (Kruger, 1986)	>14% de formas normais
Aspermia	Ausência de ejaculado
Oligozoospermia	Concentração $< 20 \times 10^6$ spzt/ml
Astenozoospermia	Motilidade < 50% de spzt A + B
Teratozoospermia	Morfologia < 30% de formas normais
Oligoastenoteratozoospermia	Distúrbio nas três variáveis seminais

Sptz = espermatozóides

As amostras seminais foram coletadas em frascos estéreis, por masturbação, devidamente identificadas e mantidas na estufa a 37°C para total liquefação. Após liquefação do sêmen realizaram-se as análises macroscópicas, verificando-se o aspecto e a cor da amostra. O volume foi medido com auxílio de uma seringa graduada e, por esta aspiração, foi possível estimar a viscosidade do sêmen, classificada como normal quando gotas eram formadas e anormal quando se verificava a formação de um filamento de mais de dois centímetros de sêmen.

O pH foi medido pela fita indicadora de pH com escala 6,4-8,0 (Merck), sobre o qual uma alíquota de sêmen era depositada sobre o papel e a cor obtida comparada com a fita de calibração colorimétrica de pH.

Para a análise da concentração de espermatozóides/ml e motilidade espermática, um volume de 10µl de sêmen liquefeito foi depositado no centro da câmara de Makler com auxílio de uma micropipeta, adaptou-se a lamínula, realizando a análise em microscopia de fase, com aumento de 200 vezes (ocular de 20 x objetiva de 10). Para avaliar a motilidade foram analisados 400 espermatozóides e este parâmetro foi executado primeiro, pois eles tendem a parar com o tempo e com a temperatura abaixo de 37° C. A concentração de espermatozóides/ml foi determinada através da contagem do número de gametas em dez quadrados da câmara de Makler. Esse processo foi repetido quatro vezes em cada amostra e obtida a média dos valores calculados para cada categoria de espermatozóides encontrados.

A vitalidade espermática foi verificada utilizando-se o método colorimétrico da Eosina amarela (Certistain 25g - Merck) na concentração de 3% em solução fisiológica e nigrosina hidrossolúvel (Certistain 25g - Merck) na concentração de 8% em solução fisiológica, filtradas e estocadas à temperatura ambiente. Com uma alíquota de 50µl do sêmen, adicionava-se uma gota de eosina e duas gotas de necrosina, e com homogeneização a partir desta mistura fez-se um esfregaço que, após sua secagem, foi imediatamente submetido a quatro contagens de 100 espermatozóides cada, no microscópio (em aumento de 400 vezes) e obtida a média. O resultado foi apresentado em porcentagem total de espermatozóides vivos (não corados) quando comparados a espermatozóides mortos (corados).

A avaliação da morfologia espermática foi realizada por meio da coloração de Shorr, em esfregaços de alíquotas de 10µl de sêmen fresco em lâminas com extremidade fosca (identificadas com nome do indivíduo e data). A metodologia foi constituída de passagens nos seguintes reagentes:

1. álcool 70% por 15 minutos;
2. água corrente;
3. corante de hematoxilina por um minuto;
4. água corrente;
5. álcool 90% (três passagens sucessivas);
6. corante de Shorr por 5 minutos;
7. álcool 95% (três passagens sucessivas);
8. álcool absoluto (três passagens sucessivas);
9. álcool – xilol (1:1);
10. xilol (duas passagens sucessivas e, na segunda passagem, permanece por 20 minutos).

A leitura da morfologia foi feita com objetiva de imersão (ocular 100 x objetiva de 10) e foram classificados pelo menos 400 espermatozóides quanto à forma, segundo os critérios da WHO (1992) e de Kruger et al. (1986), em dois grupos:

- A. Normal: cabeça levemente ovalada, única, lisa, sem gotas citoplasmáticas e com acrossoma ocupando cerca de 40% a 70% da cabeça. O diâmetro de 3 a 5 μ m, alinha-se com eixo longitudinal da cabeça e não apresentando expansões laterais. A cauda única e desenrolada, com um tamanho de 45 μ m.
- B. Anormal: defeitos no acrossoma: acrossoma pequeno (<40%) e acrossoma grande (>70%); defeitos no corpo e peça intermediária: peça intermediária larga, gota intracitoplasmática e peça intermediária separada; defeitos estruturais: piriforme, achatado, forma ampulheta, superfície irregular, mais de dois vacúolos, achatado no sítio de implantação da cauda, não ovalada de um lado e redonda; defeitos na cauda: inserção; espiralada; ângulo>90%.

Além disso, foram analisadas as chamadas formas imaturas definidas como células esféricas que apresentam diâmetro nuclear entre 4 e 9 μ m e ausência de cauda.

A morfologia dos espermatozóides, segundo critérios morfológicos estritos (KRUGER et al., 1986), apresenta formas ovais perfeitas. Considera-se normal a presença de pelo menos 14% de espermatozóides com: cabeça lisa e oval; eixo longo da cabeça deve ter entre 5 e 6 μ m e o eixo curto entre 2,5 e 3,5 μ m; o acrossoma deve cobrir 40% a 60% da cabeça do espermatozóide; não pode existir anomalia de peça intermediária ou cauda e a peça intermediária deve ter menos que 1 μ m de largura e até uma vez e meia o comprimento da cabeça do espermatozóide.

O teste de leucocitospermia (Teste de Endtz) (ENDTZ, 1972) foi realizado em células suspensas de sêmen liquefeito e quantificado em uma câmara de Makler. Granulócitos positivos para a reação de peroxidase (neutrófilos, leucócitos polimorfonucleares e macrófagos) foram identificados por coloração de imunohistoquímica. Este teste é baseado no fato de que os leucócitos presentes na amostra seminal coram-se de marrom-escuro, ou seja, são células peroxidase-positivo.

3.1 Análise Estatística

O cálculo amostral foi realizado baseado nas variáveis vitalidade, motilidade e morfologia, com as médias e desvios-padrões, entre os dois grupos do presente estudo. Para que o poder estatístico fosse igual ou superior a 80%, a amostra mínima seria de 85 indivíduos por grupo. Entretanto, devido às dificuldades encontradas, os tamanhos amostrais utilizados neste trabalho foram de 57 e 50 indivíduos nos grupos estudo e controle respectivamente, com um poder estatístico em torno de 60%.

Entre os grupos, para a comparação estatística de idade, tempo de infertilidade, prole, tabagismo, tempo de abstinência, volume seminal, pH seminal, tempo de liquefação, motilidade espermática, morfologia pelo critério da OMS e de Kruger, utilizou-se o teste *t de Student* para populações dependentes e independentes e os resultados expressos em média e desvio padrão.

A concentração de espermatozóides, presença de leucócitos no sêmen e teste da peroxidase foram analisados utilizando-se o teste de Mann-Whitney (não paramétrico) para amostras independentes e o teste de Wilcoxon para amostras dependentes. Os resultados foram expressos em mediana com valores do 1º e 3º quartil.

Para todas as análises estatísticas utilizadas considerou-se um nível de significância de 5% ($p < 0,05$) e o programa utilizado foi o SAS versão 9.1.

4. Resultados

Na tabela 2 estão representadas as características dos homens inférteis e férteis. Nossos resultados revelaram que a média das idades e do hábito tabagista dos homens inférteis são semelhantes ao grupo de férteis.

Tabela 2 - Características dos homens inférteis e dos férteis

Variável	Inférteis (n=57)	Férteis (n=50)	P valor
Idade (anos) ¹	31,0±5,6	30,3±6,5	0,55
Tabagismo (%) ¹	29,8	22,0	0,36
Prole ¹	0,07±0,32	1,8±1,8	<0,001
Tempo de infertilidade (anos) ¹	3,9±2,8	0,0±0,0	<0,001

1. Teste t de Student para populações independentes – valores expressos como média ± desvio-padrão

Na tabela 3 está representado os parâmetros seminais alterados dos indivíduos inférteis antes e em uso de polivitamínico e polimineral e dos homens saudáveis comprovadamente férteis.

Tabela 3. Parâmetros Seminais dos indivíduos inférteis antes e em uso de polivitamínico e polimineral e férteis.

Variáveis	Inférteis Antes do uso (%/n)	Inférteis Em uso (%/n)	Férteis (%)
Concentração > 20milhões/ml	49 (86%)	52 (91%)	50 (100%)
Motilidade A+B > 50%	24 (74%)	49 (86%)	49 (98%)
Morfologia > 30%	16 (28%)	26 (46%)	19 (38%)
Concentração e Motilidade e Morfologia normais	0 (0%)	13 (23%)	10 (20%)

Valores de acordo com a WHO (1999)

Com o uso de polivitamínico e polimineral houve um aumento na porcentagem de indivíduos com concentração, motilidade e morfologia normal, além do aumento no número dos indivíduos normozoospermicos.

A comparação dos parâmetros seminais dos indivíduos inférteis antes do uso e em uso de polivitamínico e polimineral por 90 dias com a dos homens férteis sem uso destas substâncias foram apresentadas na tabela 4.

Tabela 4 - Comparação dos parâmetros seminais de homens inférteis antes do uso, durante o uso de polivitamínico e polimineral por 90 dias e dos férteis sem uso destas substâncias

Variáveis	Inférteis Antes do uso (n=57)	Inférteis Em uso (n=57)	Férteis (n=50)	P valor		
				Inférteis Antes do uso X Inférteis Em uso	Inférteis antes do uso X Férteis	Inférteis em uso X Férteis
Volume (ml) ¹	3,9±1,6	3,9±2,1	3,0±1,4	0,93	0,0002*	0,008*
pH ¹	7,5±0,2	7,5±0,2	7,5±0,2	0,32	0,96	0,48
Liquefação (minutos) ¹	37,7±15,3	39,6±12,4	38,4±16,3	0,47	0,82	0,68
Concentração/ml ² (x 10 ⁶)	68,0[37,8;101,2]	68,0[28,8;102,5]	96,5[49,0;144,2]	0,48	0,037*	0,026*
Motilidade A+B (%) ¹	61,5±19,0	64,0±15,9	66,9±19,3	0,24	0,14	0,38
Critério da Morfologia de Kruger ¹ (%)	6,9±4,1	9,1±5,2	8,2±4,8	0,002*	0,13	0,33
Critério da Morfologia OMS ¹ (%)	18,3±9,6	22,6±11,8	20,9±9,4	0,006*	0,17	0,39
Vitalidade (%) ¹	85,4±9,2	85,6±9,1	89,6±6,9	0,90	0,011*	0,014*
Leucócitos ² (x 10 ³)	600,0[300,0;121,5]	750,0[425,0;1406,2]	350,0[100,0;675,0]	0,21	0,004*	<0,001

1. Teste t de Student para populações independentes e dependentes – valores expressos como média ± desvio-padrão

2. Teste de Mann-Whitney para populações independentes e Teste de Wilcoxon para populações dependentes – valores expressos como mediana [IQ_{25%};IQ_{75%}]

*p< 0,05

Nos indivíduos inférteis, o uso de polivitamínico e polimineral aumentou significativamente a morfologia tanto pelos critérios estabelecidos pela WHO (1992) como por Kruger et al. (1986) e não significativamente a motilidade linear dos espermatozoides. Os outros parâmetros dos homens inférteis se mantiveram quanto seus valores médios e medianos. Observou-se que as médias e as medianas de todos os parâmetros seminais analisados antes e em uso de micronutrientes nos indivíduos inférteis e férteis encontravam-se dentro dos valores de normalidade preconizados pela WHO, exceto para a morfologia espermática, que estavam abaixo de 14% (critérios de Kruger) e 30% (WHO).

Verificou-se que os homens inférteis antes do uso de micronutrientes quando comparados aos férteis apresentavam significativamente uma menor concentração de espermatozoides/ml e vitalidade além de uma maior contagem de leucócitos e volume espermático. Os parâmetros seminais dos indivíduos inférteis em uso de polivitamínico e polimineral foram comparáveis ao grupo de indivíduos comprovadamente férteis com exceção da concentração e vitalidade de espermatozoides que foram significativamente inferiores.

Em relação ao tempo de abstinência sexual no grupo de inférteis sem uso de micronutrientes foi observado uma variação de 1 a 14 dias ($4,9 \pm 2,2$); quando estes estavam em uso dessas substâncias foi de 2 a 10 dias e no grupo de homens férteis a variação ficou entre 1 a 20 dias ($4,1 \pm 3,4$), não apresentando diferenças estatísticas significantes entre os grupos.

Dos 57 casais estudados 24,5% (14/57) conseguiram engravidar quando seus parceiros estavam em uso de polivitamínico e polimineral. Estes casais apresentavam tempo de infertilidade variando de três a oito anos e a média das idades das mulheres foi $27,4 \pm 5,7$ com idade mínima de 18 e máxima de 42 anos.

5. Discussão

Na avaliação das características dos indivíduos inférteis com os saudáveis comprovadamente férteis verificamos que os grupos eram semelhantes em relação à idade e ao hábito tabagista. Essa semelhança foi pré-requisito básico para as comparações, já que na literatura, há relatos consistentes sobre a piora na qualidade seminal de forma progressiva em homens com exposição ao fumo (TRUMMER et al., 2002) e com aumento da idade (PASQUALOTTO et al., 2005).

De acordo com os critérios preconizados pela WHO (1999) verificamos que apenas 20% (10/50) dos homens férteis apresentaram todos os seus parâmetros seminais dentro da normalidade e que somente 38% tinham espermatozóides morfolologicamente normais. Enquanto os inférteis antes do uso de micronutriente mostraram pelo menos um parâmetro seminal anormal. É interessante observar que 86% (49/57) dos indivíduos inférteis antes do uso de polivitamínico e polimineral apresentaram concentração acima de 20 milhões de espermatozóides/ml, 74% (42/57) motilidade espermática linear superior a 50% e que 28% (16/57) tiveram morfologia dos espermatozóides normais. Quando estavam em uso dos micronutrientes a porcentagem de indivíduos aumentaram em relação à concentração (91%), motilidade (86%) e morfologia (46%) espermática.

Nossos resultados são coerentes aos descritos por Chia et al. (1998) que verificaram que os 243 homens férteis do seu estudo tinham uma média de espermatozóides morfolologicamente normais abaixo dos valores de normalidade e por Pasqualotto et al. (2006b) onde observaram que 87% dos homens comprovadamente férteis e desejosos de realizar uma cirurgia de vasectomia apresentaram também valores de morfologia espermática inferiores aos da WHO (1999). Nallella et al. (2006), encontraram uma significativa porcentagem de homens férteis com morfologia anormal de espermatozóides e de indivíduos inférteis com concentração espermática normal ao compararem 56 homens com fertilidade comprovada com 91 doadores normais, 406 com investigação para infertilidade e 166 homens com fator de infertilidade masculina.

Ao compararmos os indivíduos inférteis antes do uso de polivitamínico com os férteis, verificamos que estes últimos apresentaram uma maior concentração e vitalidade espermática significativa. A motilidade e morfologia dos espermatozóides, apesar de serem superiores nos indivíduos férteis em relação aos inférteis sem uso de micronutrientes, não apresentou diferença significativa. A comparação dos parâmetros seminais entre inférteis em uso de micronutrientes e férteis em valores medianos à concentração espermática e valores médios à vitalidade manteve significativamente superior aos inférteis. A média da motilidade dos espermatozóides foi maior nos indivíduos férteis que nos inférteis, mas sem diferença

significativa. Observou-se que apesar da média dos espermatozóides com morfologia normal para os critérios estabelecidos por WHO (1992) e Kruger et al. (1986) terem aumentado com o uso de polivitamínico e polimineral e serem superiores aos dos indivíduos férteis não foram observadas diferenças significativas nestes parâmetros.

Uma hipótese, que justificaria tais diferenças nos grupos em relação à concentração e à vitalidade dos espermatozóides entre férteis e inférteis seria que os indivíduos inférteis possuem um número maior de espécies reativas de oxigênio no sêmen (PASQUALOTTO et al., 2000) as quais são conhecidas por serem indutores de apoptose em espermatozóides maduros (MURARO et al., 2007) o que levaria a morte celular (VILLEGAS et al., 2003) e consequentemente uma diminuição na vitalidade e no número de espermatozóides.

O número elevado de leucócitos observado no sêmen dos homens inférteis pode também ter contribuído com a qualidade seminal inferior observada nesses indivíduos quando comparadas com os homens férteis, já que essas células são as principais formadoras de EROs no líquido seminal (AGARWAL et al., 2008; TREMELLEN, 2008). Bezold et al. (2007), verificaram que a prevalência de DST no sêmen de indivíduos inférteis são semelhantes aos indivíduos com ou sem leucocitospermia e que a presença de DST assintomática em indivíduos inférteis estão associados com pobre qualidade seminal. Por outro lado, Muraro et al. (2007), em estudo realizado com 90 pacientes submetidos à triagem para infertilidade, apesar de observar aumento da concentração de espermatozóides com a presença de leucócitos, concluíram que estas células no sêmen podem não estar associadas com parâmetros anormais do espermograma.

O aumento de espermatozóides com formas normais nos indivíduos inférteis com uso de micronutrientes e a taxa de gestação de 25,4% indicam que a morfologia pode desempenhar um papel importante na fertilidade dos indivíduos inférteis, apesar dos resultados encontrados estarem abaixo dos valores de normalidade estipulados pela WHO (1999) e Kruger et al. (1986). O que foi observado por Nallella et al. (2006) que sugeriram que a morfologia em valores mais baixos que os preconizados pela WHO (1999) podem melhor discriminar indivíduos férteis de inférteis. Estes dados são coerentes com os de Chia et al. (1998) que observaram que a morfologia seria melhor preditor para a gravidez. E que a morfologia normal é uma característica essencial para a fecundação *in vivo* e fertilização *in vitro* (COETZEE et al., 1998). Entretanto, Guzick et al., (2001) ao avaliarem os parâmetros seminais de 765 casais inférteis e 696 férteis concluíram que os parâmetros seminais não são diagnósticos de fertilidade já que observaram uma sobreposição das características espermáticas em relação a concentração motilidade e morfologia entre estes indivíduos.

A melhora estatisticamente significativa observada na porcentagem de espermatozóides morfológicamente normais e não significativa da motilidade espermática linear dos homens inférteis no nosso estudo, pode ser explicada devido ao uso de polivitamínico e polimineral por 90 dias. O uso de micronutriente com poder antioxidante parece ter atenuado a ação dos radicais livres, que alteram a membrana plasmática e o DNA espermático. O que levaria ao menor número de espermatozóides com formas anormais, e, conseqüentemente com uma melhor motilidade. A redução do número de espermatozóides anormais poderia diminuir também a quantidade de EROs no sêmen, visto que estas células são uma das principais fontes destas substâncias. A provável redução da peroxidação lipídica dos ácidos graxos poliinsaturados, os quais são relevantes para fornecer à membrana plasmática a fluidez necessária para a fusão das membranas dos gametas, podem estar associados com a fertilização (KRAUSE et. Al., 2003; HENKEL et. Al., 2003). Desta forma o sêmen com maior quantidade de antioxidante e menor de EROs reduziria os danos provocados pelos radicais livres nas biomoléculas. Estes resultados sugerem que o uso de micronutrientes com ação antioxidante, possivelmente interferem na qualidade seminal e eventualmente melhoraram a fertilidade dos homens inférteis. Entretanto outros mecanismos, não podem ser descartados.

Nossos resultados mostraram que o uso oral diário de ácido fólico (5 mg), β -caroteno (10.000 UI), ácido ascórbico (600mg), acetato de tocoferol (200 UI), cobre (1,0 mg), selênio (100 mg) e zinco (40 mg) por um período de 90 dias não melhorou estatisticamente a concentração e motilidade e sim a morfologia dos espermatozóides. Sendo compatíveis com os de Vezina et al. (1996) quanto a morfologia, mas diferem em relação a motilidade. Eles encontraram um significativo aumento na motilidade espermática e nos espermatozóides com formas normais de nove oligoastenoterazoospermicos que receberam 400mg/dia de α -tocoferol em combinação com selênio (100 μ g/d por um mês e 200 μ g/d por aproximadamente 6 meses).

Em relação à concentração espermática nossos resultados diferem dos estudos de Kodama et al. (1997) que avaliaram 36 homens inférteis usando por dois meses 200 mg de vitaminas C e E além de 400 mg de glutatona; Comhaire et al. (2000) que estudaram 27 homens inférteis em uso de acetilcisteína (600 mg) ou β -caroteno (300 mg) mais vitamina E (180 mg) durante 6 meses e dos estudos de Wong et al. (2002) onde 103 homens inférteis fizeram uso por 26 semanas de ácido fólico (5 mg) e zinco (66 mg) que verificaram melhora apenas na concentração espermática.

Quanto à motilidade nossos estudos foram diferentes dos resultados encontrados por Suleiman et al. (1996), em seu estudo randomizado, duplo-cego, placebo controlado, com 110 astenozoospermicos tratados com vitamina E oral (300 mg duas vezes ao dia) por 6 meses, que observaram melhora significativa da motilidade dos espermatozoides em 60% dos pacientes. Scott et al. (1998) em um estudo realizado com oligoastenoterazoospermicos e inférteis utilizando selênio, vitaminas A, E e C por três meses e Keskes et al., (2003) após a suplementação com vitamina E (400mg) e selênio (225µg) por três meses em grupo de férteis e inférteis também verificaram melhora na motilidade dos espermatozoide.

Nossas observações também diferem dos autores que verificaram melhora na concentração e na motilidade simultaneamente como Omu et al. (1998) que avaliaram o sêmen de 100 astezoospermicos em uso de 250 mg de zinco por três meses e Eskenasi et al. (2005) ao compararem o sêmen de 97 homens saudáveis com suplementação de zinco, folato, vitamina C, E e β-caroteno.

Kessopoulou et al. (1995) com 30 homens inférteis usando por três meses vitamina E (600 mg); Moilanen e Hovatta (1995) que utilizou vitamina E em 15 homens inférteis por três semanas; Iwanier e Zachara (1995) que suplementaram 33 homens inférteis com 200 µg de selênio e Rolf et al. (1999) que utilizaram 1000 mg de vitamina C e 800 mg de vitamina E em 31 astenozoospermicos por 56 dias que não encontraram melhora estatística em nenhum dos três parâmetros seminais.

As divergências dos resultados entre os diferentes estudos podem se dever, em parte: ao tempo de uso dos micronutrientes, que em alguns trabalhos foi inferior ao estipulado para a espermatogênese, que varia de 64 (MISELL et al., 2006) a 72 (BUSCH et al., 2004) dias, o que provavelmente não mostra o real efeito dos micronutrientes nos parâmetros seminais justificando parte das diferenças encontradas; ao uso isolado de micronutriente em alguns trabalhos e, em outros, o uso combinado de duas ou mais substâncias; ao delineamento do estudo, enquanto alguns trabalhos foram prospectivos e/ou duplo cego e/ou randomizado e/ou placebo controlado outros foram retrospectivo; a variações nas características populacionais; ao número de participantes envolvido nos trabalhos e a subjetividade inerente à análise seminal.

A avaliação dos parâmetros seminais utilizados em nosso estudo foi a análise clássica de rotina por meio de avaliações microscópicas padronizadas pela OMS e analisadas por uma mesma equipe, na tentativa de diminuir a subjetividade na análise espermática. Apesar de a análise seminal não ser considerado o parâmetro ideal para predizer a fertilidade ela continua sendo utilizada na prática clínica.

O poder estatístico da nossa casuística de 60% limita a interpretação dos nossos dados. Poderíamos justificar o número de casos pelo pudor ou constrangimento da coleta do sêmen, dificuldade em seguir o tratamento por 90 dias e não continuidade do mesmo, gravidez durante o uso de micronutrientes e ao desinteresse por parte dos indivíduos do grupo controle que já tinham sua fertilidade comprovada.

A abstinência sexual antes da realização do espermograma apresentou ampla variabilidade nos indivíduos inférteis antes e com uso de polivitamínico e polimineral assim como nos homens férteis. Embora a mediana do tempo de abstinência se encontrar dentro dos valores preconizados pela WHO (1999), possivelmente esse dado possa interferir na análise dos resultados, já que não foi possível realizar o espermograma com o período de abstinência de dois a três dias. Um maior período de abstinência, em homens normozoospermicos, leva a um aumento na concentração espermática e no volume seminal, porém a qualidade espermática sofre deterioração, havendo diminuição na porcentagem da motilidade (ELZANATY et al., 2005) e no número de espermatozoides morfologicamente normais; (LEVITAS et al., 2005). Levitas et al. (2005) demonstraram que a deterioração dos parâmetros seminais está inversamente relacionada ao período de abstinência sexual e recomendaram que a coleta de sêmen em indivíduos férteis não deveria ser realizada por um período maior que dez dias e que nesses homens, a melhor amostra poderia ser coletada após um dia de abstinência sexual. Estes dados podem explicar, em parte, o alto número de indivíduos com espermatozoides morfologicamente anormais em ambos os grupos deste estudo e, no grupo de inférteis, indivíduos com uma alta concentração de espermatozoides por ml. Podemos inferir também que, apesar do tempo de abstinência influenciar na qualidade seminal, provavelmente não está relacionado com a fertilidade, já que o grupo de homens comprovadamente férteis foi semelhante ao grupo de homens inférteis em relação ao tempo de abstinência sexual.

Estudos adicionais com maior número de indivíduos, duplo-cegos, randomizados, placebo controlado e com dosagens no sangue e sêmen dos micronutrientes, aliados às técnicas avançadas como detecção de EROs e capacidade antioxidante total do sêmen, além de identificação da integridade do DNA, poderiam esclarecer os mecanismos de ação de cada micronutriente utilizado levando a uma melhor compreensão dos efeitos benéficos ao sistema reprodutor masculino.

6. *Conclusão*

O uso combinado de ácido fólico, β -caroteno, α -tocoferol, ácido ascórbico, selênio, cobre e zinco no presente estudo aumenta significativamente a porcentagem de espermatozoides morfológicamente normais dos homens inférteis. Não houve melhora estatística significativa de outros parâmetros seminais como concentração, motilidade e vitalidade. Os parâmetros seminais dos indivíduos inférteis mesmo com uso de micronutrientes são inferiores quanto a concentração e vitalidade espermática em relação aos indivíduos saudáveis comprovadamente férteis.

Referências

AGARWAL A.; NALLELLA K.P.; ALLAMANENI S.S.; SAID T.M. Role of antioxidants in treatment of male infertility: an overview of the literature. **Reprod Biomed online**, 8, p. 616-627, 2004.

AGARWAL A.; MAKKER K.; SHARMA S. Clinical relevance of oxidative stress in male factor infertility: an update. **AJRI**, 59, p. 2-11, 2008,.

ALKAN I.; SIMSEK F.; HAKLAR G.; KERVANCIOGLU E.; OZVERI H.; YALCIN S. et al. Reactive oxygen species production by the spermatozoa of patients with idiopathic infertility: relationship to seminal plasma antioxidants. **J Urol.**, 157(1), p.140-143, 1997.

AMERICAN SOCIETY FOR REPRODUCTIVE MEDICINE, Birmingham, Alabama. Definitions of infertility and recurrent pregnancy loss. **Fertility and Sterility**, 89(6), 2008.

BAYNES J.W.; DOMINICZAK, M. H. **Bioquímica médica**. 2. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007.

BEZOLD G.; POLITCH J. A.; KIVIAT, N. B.; KUYPERS J. M. WOLFF H.; ANDERSON D. J. Prevalence of sexually transmissible pathogens in semen from asymptomatic male infertility patients with and without leukocytospermia. **Fertility and Sterility**, 87(5), p.1087-1097, 2007.

BUSCH R.; CESAR D.;HIGUERA-ALHINO D.; GEE T.; HELLERSTEIN M. K.; MCCUNE, J. M. Isolation of peripheral blood CD4(+) T cells using rosettesep and MACS for studies of DNA turnover by deuterium labeling. **J Immunol Methods**, 286, p. 97, 2004.

COETZEE K.; KRUGER T. F.; LOMBARD C. J. Predictive value of normal sperm morphology: a structured literatura review. **Human reproduction Update**, 4, p. 73-82, 1998.

CHUNG, S.S.; WOLGEMUTH, D.J. Role of retinoid signaling in the regulation of spermatogenesis. **Cytogenet Genome RES.**, 105, p. 189-202, 2004.

CHIA S. E.; TAY S. K.; LIM S.T. What constitutes a normal seminal analysis? Semen parameters of 243 fertile mem. **Human reproduction**, 13, p. 3394-3398, 1998.

COMHAIRE, F. H.; CHRISTOPHE, A. B.; ZALATA, A. A.; DHOOGHE, W.S.; MAHMOUD, A.M.A.; DEPUYDT, C.E. The effects of combined conventional treatment, oral antioxidants and essential fatty acids on sperm biology in subfertile men. **Prostaglandins Leucotrienes and essential Fatty Acids**, 63, p. 159-165, 2000.

COMHAIRE, F. H.; MAHMOUD, A. The role food supplements in the treatment of the infertile man. **RBM Online**, 7(4), p. 385-391, 2003.

* ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: Informação e documentação – Referências – Elaboração. Rio de Janeiro, 2002. 24p.

-
- COZZOLINO, S.M.F. Vitamina E (tocoferol) e carotenóides. In: COZZOLINO, S.M.F. **Biodisponibilidade de nutrientes**. Barueri, SP: Manole, p.276-292, 2007.
- EBISCH, I. M. W. et al. The importance of folate, zinc and antioxidants in the pathogenesis and prevention of subfertility. **Human Reproduction Update**, 13(2), p. 163-174, 2007.
- ENDTZ, A. W. A. Direct staining method for moist urinary sediment and moist human sperm. **Ned. Tijdschr Geneesk**, 116, p. 681-685, 1972.
- ELZANATY, S.; MALM, J.; GIWERCMAN, A. Duration of sexual abstinence: epididymal and accessory sex gland secretions and their relationship to sperm motility. **Human Reproduction**, 20(1), p. 221-225, 2005.
- ESKENAZI, B.; KIDD, S.A.; MARKS, A.R.; SLOTER, E.; BLOCK, G.; WYROBEK, A.J. Antioxidant intake is associated with semen quality in healthy men. **Human Reproduction**, 20 (24), p. 1006-1012, 2005.
- FORESTA, C.; FLOHÉ, L.; GAROLLA, A. et al. Male fertility is linked to the selenoprotein phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. **Biology of Reproduction**, 67, p. 967-971, 2002.
- FUJII, J.; MATSUKI, S.; ISHII T. Cooperative function of antioxidant and redox systems against oxidative stress in male reproductive tissues. **Asian J Androl.**, 5, 231-242, 2003.
- GARRIDO, N.; MESEGUER M.; SIMON, C., PELLICER, A.; REMOHI, J. Pro-oxidative and anti-oxidative imbalance in human semen and its relation with male fertility. **Asian J Androl.**, 6, p.59-65, 2004.
- GONZAGA, I.B.; MARTENS, A.; COZZOLINO, S.M.F. Selênio. In: COZZOLINO, S.M.F. **Biodisponibilidade de nutrientes**. Barueri, SP: Manole, p.575-613, 2007.
- GUZICK, D.S.; OVERSTREET, J.W.; FACTOR-LITVAK, P.; BRAZIL, C.K.; NAKAJIMA, S.T.; COUTIFARIS, C. et al. Sperm morphology, motility, and concentration in fertile and infertile men. **N Engl J Med.**, 345(19), p.1388-393, 2001.
- HENKEL R.; MAA G.; HAJIMOHOMMAD M.; MENKVELD R.; STALF T.; VILLEGAS J.; SÁNCHEZ R.; KRUGER T. F.; SCHILL W. B. Urogenital inflammation: changes of leucocytes and ROS. **Andrologia**, 35, p. 309-311, 2003.
- IWANIER, K.; ZACHARA, B. A. Selenium supplementation enhances the element concentration in blood and seminal fluid but does not change the spermatozoal quality characteristics in subfertile men. **Journal of Andrology**, 16, p. 441-447, 1995.
-

JOSHI, R.; ADHIKARI, S.; PATRO, B. S.; CHATTOPADHYAY, S.; MUKHERJEE, T. Free radical scavenging behavior of folic acid: evidence for possible antioxidant activity. **Free Radic Biol Med**, 30, p. 1390-1399, 2001.

KAO, S.; CHAO, H.C.; CHEN, H.; HWANG, T.I.S.; LIAO, T., WEI, Y. Increase of oxidative stress in human sperm with lower motility. **Fertility and Sterility**, 89(5), p.1183-1190, 2008.

KESKES-AMMAR, L.; FEKI-CHAKROUN, N.; REBAI, T. et al. Sperm oxidative stress and the effect of an oral vitamin E and selenium supplement on semen quality in infertility men. **Archives of Andrology**, 49, p. 83-94, 2003.

KESPOPOULOU, E.; POWERS, H. J.; SHARMA, K. K. et al. A double-blind randomized placebo crossover controlled trial using the antioxidant vitamin E to treat reactive oxygen species associated male infertility. **Fertility and Sterility**, 64, p. 825-831, 1995.

KODAMA, H.; TAMAGUCHI, R.; FUKUDA, J. et al. Increased oxidative deoxyribonucleic acid damage in the spermatozoa of infertile male patients. **Fertility and Sterility**, 68, p. 519-524, 1997.

KRAUSE W.; BOHRING C.; GUETH A.; HORSTER S.; KRISP A.; SKRZYPEK J. Cellular and biochemical markers in semen indicating male accessory gland inflammation. **Andrologia**, 35, p. 279-282, 2003.

KRUGER, T. F.; MENKVELD, R.; STANDER, F. S.; LOMBARD, C. J. J. P. Sperm morphologic features as a prognostic factor in in vitro fertilization. **Fertility and Sterility**, 46(6), p. 203-210, 1986.

LEVITAS, E.; LUNENFELD, E.; WEISS, N.; FRIGER, M.; HAR-VARDI, I.; KOIFMAN, A. et al. Relationship between the duration of sexual abstinence and semen quality: analysis of 9,489 semen samples. **Fertility and Sterility**, 83(6), p. 1680-1686, 2005.

LEWIS, S. E.; STERLING, E. S.; YOUNG, I. S. et al. Comparison of individual antioxidants of sperm and seminal plasma in fertile and infertile men. **Fertility and Sterility**, 67, p. 142-147, 1997.

MAFRA, D.; COZZOLINO, S.M.F. Ácido fólico. In: COZZOLINO, S.M.F. **Biodisponibilidade de nutrientes**. Barueri, SP: Manole, p.385-399, 2007.

MAIORINO, M.; WISSING, J.B.; BRIGELIUS-FLOHÉ, R.; CALABRESE, FIORELLA; ROVERI, A.; STEINERT, P.; URSINI, F.; FLOHÉ, L. Testosterone mediates expression of the selenoprotein PHGPx by induction of spermatogenesis and not by direct transcriptional gene activation. **The FASEB Journal**, 12, p. 1359-1370, 1998.

MENNELLA, M.; JONES, R., Properties of spermatozoal superoxide dismutase and lack involvement of superoxides in metal-ion-catalysed lipid-peroxidation and reactions in semen. **Biochem J.**, 191, p. 289-297, 1980.

MISELL, L. M.; HOLOCHWOST, D.; BOBAN, D.; SANTI, N.; SHEFI, S.; HELLERSTEIN, M. K. et al. A stable isotope-mass spectrometric method for measuring human spermatogenesis kinetics in vivo. **J Urol**, 175(1), p. 242-246, 2006.

MOILANEN, J.; HOVATTA, O. Excretion of alpha-tocopherol into human seminal plasma after oral administration. **Andrologia**, 27, p. 133-136, 1995.

MURARO, F.; HENNEMANN, T. C.; ANZOLCH, K. J.; OLIVEIRA, O. L. M. Efeito da leucocitospermia na análise do sêmen. **RBAC**, 39(1), p. 47-50, 2007.

NALLELLA, K. P.; SHARMA, R. K.; ALLAMANESI, S. S. R.; AGARWAL, A. Identification of male factor infertility using a novel semen quality score and reactive oxygen species levels. **Clinics**, 60(4), p. 317-324, 2005.

NALLELLA, K. P.; SHARMA, R. K.; NABIL, A.; AGARWAL, A. Significance of sperm characteristics in the evaluation of male infertility. **Fertility and Sterility**, 85(3), p. 629-634, 2006.

NATIONAL INSTITUTE FOR CLINICAL EXCELLENCE (NICE). Fertility: assessment and treatment for people with fertility problems. **Clinical Guidelines**, February 2004.

OMU, A. E.; DASHTI, H.; AL-OTHMAN, S. Treatment of asthenozoospermia with zinc sulfate: andrological, immunological and obstetric outcome. **European Journal Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, 79, p. 179-184, 1998.

PASQUALOTTO F.F.; SHARMA R.K.; NELSON D.R.; THOMAS A.J.; AGARWAL A. Relationship between oxidative stress, semen characteristics, and clinical diagnosis in men undergoing infertility investigation. **Fertility and Sterility**, 73(3), p. 459-64, 2000.

PASQUALOTTO, F. F.; SILVA, C. O.; UMEZU, F. M.; PASQUALOTTO, E. B.; SALVADOR, M.; AGARWAL, A. Relationship between sexual abstinence period and oxidative stress in infertile men. **Fertility and Sterility**, 84 (1), p. S458, 2005.

PASQUALOTTO, E. B.; PASQUALOTTO, F. F. Espermograma e testes de função espermática. **Femina**, v. 34, p. 92-98, 2006a.

PASQUALOTTO, F. F.; SOBREIRO, B. P.; HALLAK, J.; ATHAYDE, K. S.; PASQUALOTTO, E. B.; LUCON, A. M. High percentage of abnormal semen parameters in a prevasectomy population. **Fertility and Sterility**, 85(4), p. 954-60, 2006b.

PEDROSA, L.F.C.; COZZOLINO, S.M.F. Cobre. In: COZZOLINO, S.M.F. **Biodisponibilidade de nutrientes**. Barueri, SP: Manole, p.533-548, 2007.

ROLF, C.; COOPER, T. G.; YEUNG, C. H. et al. Antioxidant treatment of patients with asthenozoospermia or moderate oligoasthenozoospermia with high-dose vitamin C and vitamin E: a randomized, placebo-controlled, double-blind study. **Human Reproduction**, 14, p. 1028-1033, 1999.

SCOTT, R.; MACPHERSON, A.; YATES, R. W. et al. The effect of oral selenium supplementation on human sperm motility. **British Journal of Urology**, 82, p. 76-80, 1998.

SONG, G.J.; NORKUS, E.P.; LEWIS, V. Relationship between seminal ascorbic acid and sperm DNA integrity in infertile men. **Int. J. Androl.**, 29, p.569-575, 2006

SULEIMAN, S. A.; ALI, M. E.; ZAKI, Z. M. et al. Lipid peroxidation and human sperm motility: protective role of vitamin E. **Journal of Andrology**, 17, p. 530-537, 1996.

TIKKIWAL, M.; AJMERA, R. L.; MATHUR, N. K. Effect of zinc administration on seminal zinc and fertility of oligospermic males. **Indian J Physiol Pharmacol**, 31, p. 30-34, 1987.

TREMELLEN, K. Oxidative stress and male infertility- a clinical perspective. **Human Reproduction Update**, 14(3), p.243-288, 2008.

TRUMMER, H.; HABERMANN, H.; HAAS, J.; PUMMER, K. The impact of cigarette smoking on human semen parameters and hormones. **Hum Reprod**, 17(6), p. 1554, 2002.

VEZINA, D.; MAUFFETTE, F.; ROBERTS, K. D. et al. Selenium-vitamin E supplementation in infertile men. Effects on semen parameters and micronutrient levels and distribution. **Biological Trace Element Research**, 53, p. 65-83, 1996.

VERNET, P.; AIKEN, R.J.; DREVET, J.R. Antioxidant strategies in the epididymis. **Mol Cell Endocrinol**, 216, p.31-39, 2004.

VILLEGAS J.; KEHR K., SOTO L.; HENKEL R.; MISKA W.; SÁNCHEZ R. Reactive oxygen species induce reversible capacitation in human spermatozoa. **Andrologia**, 35, p.227-232, 2003.

WONG, W. Y.; THOMAS, C. M. G.; MERKUS, J. M. W. M.; ZIELHUIS, G. A.; STEEGERS-THEUNISSEN, R. P. M. Male factor subfertility: possible causes and the impact of nutritional factors. **Fertility and Sterility**, 73, p. 435-442, 2000.

WONG, W. Y.; FLIK, G. ; GROENEN, P. M. W.; SWINKELS, D. W.; THOMAS, C. M. G.; COPIUS-PEEREBOOM, J. H. J.; MERKUS, H. M. W. M.; STEEGERS-THEUNISSEN, R. P. M. The impact of calcium, magnesium, zinc, and copper in blood and seminal plasma on semen parameters in men. **Reproductive e Toxicology**, 15, p. 131-136, 2001.

WONG, W. Y.; MERKUS, J. M. W. M.; THOMAS, C. M. G.; MENKVELD, R.; ZIELHUIS, G. A.; STEEGERS-THEUNISSEN, R. P. M. Effects of folic acid and zinc sulfate on male factor subfertility: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. **Fertility and Sterility**, 77, p. 491-498, 2002.

WORLD HEALTH ORGANIZATION – WHO. **Laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction**. 3.ed. Cambridge: Cambridge University Press, 1992.

WORLD HEALTH ORGANIZATION – WHO. **Laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction**. 4.ed. Cambridge: Cambridge University Press, 1999.

YUYAMA, L.K.O.; MARINHO, H.A.; ALENCAR, F. H.; COZZOLINO, S.M.F. Vitamina A (retinol) e carotenóides. In: COZZOLINO, S.M.F. **Biodisponibilidade de nutrientes**. Barueri, SP: Manole, p.219-261, 2007.

YUYAMA, L.K.O.; YONEKURA, L.; AGUIAR, J.P.L.; RODRIGUES, M.L.C.F.; COZZOLINO, S.M.F. Zinco. In: COZZOLINO, S.M.F. **Biodisponibilidade de nutrientes**. Barueri, SP: Manole, p.549-574, 2007.

Anexas

ANEXO A

unesp  **UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**
CAMPUS DE BOTUCATU
FACULDADE DE MEDICINA
Departamento de Ginecologia e
Obstetrícia

BOTUCATU, SP - Rubião Jr. - Cep 18.618-970 - ☎ (14) 3811-6227/6090 - Cx Postal 530 - FAX (14) 3882-1933 - e-

mail:secretgo@fmb.unesp.br

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

(Terminologia obrigatória em atendimento a resolução 196/96-CNS-MS)

Grupo de Pesquisa (Grupo 1)

Pesquisa: **Avaliação dos parâmetros seminais de indivíduos inférteis em uso de polivitamínico e polimineral.**

Pesquisadora: Fernanda Alves Maia
Orientadora: Prof^ª. Dra. Anaglória Pontes

Esta pesquisa tem por finalidade analisar o espermograma de indivíduos inférteis que fizeram uso de polivitamínico e polimineral, comparando-os com o espermograma de indivíduos férteis.

Eu,,
registro....., fui informado que a suplementação polivitamínica e polimineral pode trazer benefícios a casais inférteis e que a comparação do espermograma com o de homens férteis (que tiveram pelo menos um filho) pode trazer melhores informações e beneficiar indivíduos inférteis. Declaro que fui suficientemente esclarecido e concordo que o resultado do espermograma, que foi realizado de rotina no ambulatório de esterilidade, seja utilizado na pesquisa supra-citada. Estou ciente de que em qualquer momento posso mudar de idéia e tenho a liberdade de recusar-me a participar deste estudo, sem qualquer prejuízo para minha pessoa. Sei que tenho garantia total de sigilo e privacidade sobre os dados que serão utilizados nesta pesquisa, sem que haja minha identificação. Não está prevista nenhuma forma de indenização ou ressarcimento durante este estudo.

Data:/...../.....

.....
.....

Assinatura do paciente

Assinatura da pesquisadora

Nome do Pesquisador: Fernanda Alves Maia
Telefone: (38) 3213-6642
e-mail: fernanda.micro@ig.com.br

Nome do Orientador: Anaglória Pontes
Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Botucatu
Telefone: (14) 3811-6227
e-mail: secretgo@fmb.unesp.br

ANEXO B

unesp  **UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**
CAMPUS DE BOTUCATU
FACULDADE DE MEDICINA
Departamento de Ginecologia e
Obstetrícia

BOTUCATU,SP- Rubião Jr.- Cep18.618-970 - ☎ (14) 3811-6227/6090 - Cx Postal 530 - FAX (14)3882-1933 - e-mail:secretgo@fmb.unesp.br

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

(Terminologia obrigatória em atendimento a resolução 196/96-CNS-MS)

Grupo Controle (Grupo 2)

Pesquisa: Avaliação dos parâmetros seminais de indivíduos inférteis em uso de polivitamínico e polimineral.

Pesquisadora: Fernanda Alves Maia
Orientadora: Prof^a. Dra. Anaglória Pontes

Esta pesquisa tem por finalidade analisar o espermograma de indivíduos inférteis que fizeram uso de polivitamínico e polimineral, comparando-os com o espermograma de indivíduos férteis.

Eu,,

registro....., fui informado que a suplementação polivitamínica e polimineral pode trazer benefícios a casais inférteis e que a comparação do espermograma com o de homens férteis, que tiveram pelo menos um filho, como eu, pode trazer melhores informações e beneficiar indivíduos inférteis. Declaro que fui suficientemente esclarecido e concordo que o resultado do espermograma, que foi realizado de rotina no Laboratório de Reprodução, seja utilizado na pesquisa supra-citada. Estou ciente de que em qualquer momento posso mudar de idéia e tenho a liberdade de recusar-me a participar deste estudo, sem qualquer prejuízo para minha pessoa. Sei que tenho garantia total de sigilo e privacidade sobre os dados que serão utilizados nesta pesquisa, sem que haja minha identificação. E que posso a qualquer momento solicitar esclarecimento e informações aos pesquisadores. Não está prevista nenhuma forma de indenização ou ressarcimento durante este estudo.

Data:/...../.....

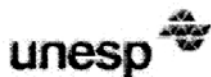
.....
Assinatura do paciente

.....
Assinatura da pesquisadora

Nome do Pesquisador: Fernanda Alves Maia
Telefone: (38) 3213-6642
e-mail: fernanda.micro@iq.com.br
Endereço: R. Prof^a Geni Leite, 32 – apto. 202 – CEP: 39400-479 - Montes Claros - MG

Nome do Orientador: Anaglória Pontes
Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Botucatu
Telefone: (14) 3811-6227
e-mail: secretgo@fmb.unesp.br
Endereço: R. Azaléia, 370 – apto. 91 – Jd. Bom Pastor – Botucatu - SP

ANEXO C



Universidade Estadual Paulista
Faculdade de Medicina de Botucatu



Distrito Rubião Junior, s/nº - Botucatu - S.P.
CEP: 18.618-970
Fone/Fax: (0xx14) 3811-6143
e-mail secretaria: capellup@fmb.unesp.br



Registrado no Ministério da Saúde em 30 de
abril de 1997

Botucatu, 07 de agosto de 2.006

OF.383/2006-CEP

*Ilustríssima Senhora
Prof. Dr. Anaglória Pontes
Departamento de Ginecologia e Obstetria
Faculdade de Medicina de Botucatu*

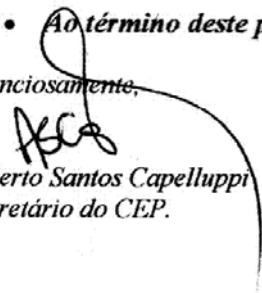
Prezada Dr^a Anaglória,

De ordem da Senhora Coordenadora deste CEP, informo que o Protocolo de Pesquisa "Avaliação dos parâmetros seminais de indivíduos inférteis com suplementação polivitamínica e polimineral", a ser conduzido por Fernanda Alves Maia, orientada por Vossa Senhoria, recebeu do relator parecer favorável, aprovado em reunião de 07/08/2006.

Situação do Projeto: APROVADO.

- Ao término deste projeto, apresentar ao CEP Relatório Final de Atividades.*

Atenciosamente,


*Alberto Santos Capelluppi
Secretário do CEP.*

ANEXO D

Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"

Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu

Laboratório de Análises Clínicas

Espermograma

Data: ___/___/___.

Horário de coleta: ___ h ___ min.

Dados Pessoais

Nome: _____

Idade: _____ Tipagem sanguínea: _____ R.G.: _____

Nome esposa: _____

Idade: _____ Tipagem sanguínea: _____ R.G.: _____

Endereço: _____ Nº _____

Cidade: _____ Estado: _____ Telefone: (____) _____

Dados Gerais

Paternidade progressa () Não () Sim Quantos filhos? _____

() com a mesma companheira () com outra(s) companheira(s)

Pessoas na família com casos de infertilidade () Não () Sim

Consangüinidade () Não () Sim

Duração da infertilidade: _____

Observação: _____

Antecedentes Clínicos e Cirúrgicos

Varicocele () Não () Sim Cirurgia () Não () Sim Data: ___/___/___

DST () Não () Sim Qual? _____

Criptorquidia () Não () Sim Cirurgia () Não () Sim

Parotidite () Não () Sim () Sem orquite () Com orquite

Diabetes () Não () Sim

Hipertensão () Não () Sim

Tuberculose () Não () Sim

Traumatismo de testículo () Não () Sim

Vasectomia () Não () Sim Data ___/___/___

Outra cirurgia: _____

Outro distúrbjo: _____

Antecedentes Ocupacionais

Profissão: _____

Metais Pesados () Não () Sim

Qual? _____ Tempo de exposição: _____ Quando: _____

Agrotóxicos () Não () Sim

Qual? _____ Tempo de exposição: _____ Quando: _____

Agentes Químicos Não Sim
 Solventes Tintas Combustíveis Fenol Outro: _____
 Tempo de exposição: _____ Quando: _____

Agentes Físicos Não Sim
 Radiação Ruídos Vibração Calor Outro: _____
 Tempo de exposição: _____ Quando: _____

Febre Não Sim Quando: _____

Medicamentos Não Sim
 Tratamento anterior: Medicamento _____
 Tempo de tratamento _____ Término do tratamento ___/___/___
 Tratamento atual: Medicamento _____
 Tempo de Tratamento _____ Previsão de término de tratamento ___/___/___

Quimioterápicos _____
 Radioterápicos _____
 Antibióticos _____
 Antifúngicos _____
 Anti-inflamatórios _____
 Anti-hipertensivo _____
 Esteróides _____
 Analgésicos _____
 Insulina _____
 Outros _____

Hábitos Pessoais e Exposição

Tabagismo Não Sim _____ cigarros/dia
 Tabagismo Passivo Não Sim
 Alcoolismo Não Sim
 Diariamente Finais de semana Ocasionalmente
 Dependência química Não Sim Tipo de droga? _____
 Frequência de uso: _____ Doses: _____
 Observação: _____

História Sexual

Impotência Não Sim Ritmo _____ vezes/semana
 Alterações da libido Não Sim
 Uso de lubrificantes Não Sim
 Observações: _____

ANEXO E**FACULDADE DE MEDICINA DE BOTUCATU
HOSPITAL DAS CLÍNICAS
LABORATÓRIO DE REPRODUÇÃO HUMANA ASSISTIDA**

Botucatu, SP – Rubião Júnior – CEP 18618-970 – (14)3811-6227/3811-6090 – FAX (14)6822-1933 – E-mail: gineco@fmb.unesp.br

ORIENTAÇÕES PARA COLETA DO SÊMEN

- 1) Guardar abstinência ou seja (não ter relações sexuais) de 3 a 5 dias antes da colheita do sêmen. Isto supõe-se que não tenha perda do sêmen por: coito ou relação sexual, masturbação ou qualquer outra circunstância durante estes dias. No dia marcado para a colheita do sêmen, comparecer ao Laboratório com o pedido do espermograma e espermocultura onde será fornecido um frasco estéril e indicado local para colheita do sêmen.
- 2) Antes de colher o sêmen, lavar as mãos só com água e enxugar. É conveniente conseguir uma excitação sexual intensa.
- 3) Colher todo o sêmen no frasco estéril fornecido previamente pelo laboratório.
- 4) Caso ocorra perda de algumas gotas de sêmen ou se derramem, favor comunicar este fato ao entregar a amostra do sêmen no laboratório.
- 5) Informar ainda na hora da entrega do sêmen no laboratório se teve:
 - a) Doença febril nos últimos 90 dias.
 - b) Se usa agrotóxicos – qual é, e há quanto tempo.
 - c) Se é fumante. Quantos cigarros por dia e há quantos anos fuma.
- 6) Avisar os dias de abstinência e a que horas colheu o sêmen.
- 7) O recipiente ou frasco com sêmen deverá ser entregue no Laboratório onde recebeu o frasco estéril, até 1 hora de colheita do sêmen.

Obs: Se tiver febre, esperar pelo menos 1 mês para realizar o exame (espermograma).

Se tiver qualquer dúvida é só perguntar quando entregar o exame.

Profª Drª Anaglória Pontes

Responsável pelo Setor de Ginecologia Endócrina e
Reprodução Humana do Dpto. Ginecologia, obstetricia
e Mastologia do HC-FMB

Artigo

Artigo a ser enviado para publicação com as normas da Revista Brasileira
de Ginecologia e Obstetria (RGO)

Avaliação dos parâmetros seminais de indivíduos inférteis em uso de polivitamínico e polimineral.

Evaluation of Semen Parameters in Infertile Individuals Using Multivitamin and Multimineral Supplements.

Fernanda Alves Maia ¹; Anagloria Pontes ²; Gisela Alessandra Daroz¹; Eliana Milanesi Rubio ³; Anice Maria Vieira de Camargos Martins ³; Lídia Raquel de Carvalho⁴;

(1) Programa de Pós-graduação do departamento de Ginecologia e Obstetrícia. Faculdade de Medicina de Botucatu. Universidade Estadual Paulista (UNESP), Botucatu, SP, Brasil.

(2) Departamento de Ginecologia e Obstetrícia. Faculdade de Medicina de Botucatu. Universidade Estadual Paulista (UNESP), Botucatu, SP, Brasil.

(3) Departamento de Urologia. Faculdade de Medicina de Botucatu. Universidade Estadual Paulista (UNESP), Botucatu, SP, Brasil.

(4) Departamento de Bioestatística. Instituto de Biociências. Universidade Estadual Paulista (UNESP), Botucatu, SP, Brasil.

Correspondência

Fernanda Alves Maia

Departamento de Ginecologia e Obstetrícia

Faculdade de Medicina de Botucatu da UNESP

Distrito Rubião Júnior, s/n – 18618-970 Botucatu, SP, Brasil

Telefone: (38) 32151783

e-mail: falvesmaia@gmail.com

RESUMO

Objetivo: Analisar os parâmetros seminais de indivíduos inférteis em uso de polivitamínico e polimineral e compará-los com indivíduos normais, comprovadamente férteis sem uso destas substâncias. Casuística e Metodologia: Foram analisados os parâmetros Seminais de 57 casais inférteis acompanhados no ambulatório de esterilidade do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu, no período de 2003 a 2007. Nos indivíduos inférteis a análise seminal foi realizada antes e com 90 dias de micronutrientes por via oral os quais foram comparados com 50 indivíduos saudáveis comprovadamente férteis sem uso destas substâncias. A avaliação do sêmen foi feita de acordo com os critérios da Organização Mundial de Saúde - OMS (1999) e morfologia de Kruger et al. (1986). A análise estatística foi feita utilizando os testes *t de Student*, Mann-Whitney e Wilcoxon, considerando um nível de significância de 5%. Resultados: Os indivíduos inférteis e os comprovadamente férteis apresentaram similaridade quanto a idade ($31,0 \pm 5,6$ versus $30,3 \pm 6,5$) ($p=0,55$) e ao tabagismo ($29,8\%$ versus $22,0$) ($p=0,36$). Nos indivíduos inférteis, o uso desses micronutrientes aumentou significativamente a morfologia tanto pelos critérios estabelecidos pela OMS ($18,3 \pm 9,6$ para $22,6 \pm 11,8$) ($p=0,006$) e por Kruger ($6,9 \pm 4,1$ para $9,1 \pm 5,2$) ($p=0,002$). Verificou-se que os homens inférteis antes do uso de micronutrientes quando comparados aos férteis apresentavam significativamente uma menor concentração de espermatozoides/ml ($68,0[37,8;101,2]$ versus $96,5[49,0;144,2]$) e vitalidade ($85,4 \pm 9,2$ versus $89,6 \pm 6,9$) e uma maior contagem de leucócitos ($600,0 [300,0;121,5]$ versus $350,0[100,0;675,0]$). Os parâmetros seminais dos indivíduos inférteis em uso de polivitamínico e polimineral foram comparáveis ao grupo de indivíduos comprovadamente férteis com exceção da concentração ($68,0[28,8;102,5]$ versus $96,5[49,0;144,2]$) e vitalidade ($85,6 \pm 9,1$ versus $89,6 \pm 6,9$) de

espermatozoides que foram significativamente inferiores. Conclusão: Nos indivíduos inférteis analisadas o uso combinado de ácido fólico, β -caroteno, α -tocoferol, ácido ascórbico, selênio, cobre e zinco aumenta significativamente a porcentagem de espermatozoides morfológicamente normais sem melhora estatística significativa de outros parâmetros seminais como concentração, motilidade e vitalidade quando comparados com os indivíduos saudáveis comprovadamente férteis.

Palavras-chave: Parâmetros seminais. Infertilidade masculina. Polivitamínico. Polimineral. Micronutriente.

ABSTRACT

Objective: To assess semen parameters in infertile individuals using multivitamin and multimineral supplements in comparison with healthy proven fertile individuals not using these substances. **Cases and Methods:** Semen parameters were evaluated in 57 infertile couples followed up in the Sterility Outpatient Clinic of Botucatu Medical School between 2003 and 2007. Semen analysis was performed before and after 90 days of oral micronutrient use in infertile individuals that were compared with 50 healthy proven fertile individuals not using these substances. Semen was evaluated according to the recommendations of the World Health Organization- WHO (1999) and the criteria described by Kruger et al. (1986). Statistical analysis was carried out using Student's *t* test and the tests of Mann-Whitney and Wilcoxon with significance set at 5%. **Results:** Infertile and proven fertile individuals showed similar age (31.0 ± 5.6 versus 30.3 ± 6.5) ($p=0.55$) and smoking status (29.8% versus 22.0) ($p=0.36$). In infertile individuals, the use of micronutrients significantly improved morphology according to the criteria of WHO (18.3 ± 9.6 to 22.6 ± 11.8) ($p=0.006$) and Kruger (6.9 ± 4.1 to 9.1 ± 5.2) ($p=0.002$). Before micronutrient use, infertile individuals compared with fertile males showed lower spermatozoa/ml concentration ($68.0[37.8;101.2]$ versus $96.5[49.0;144.2]$) and vitality (85.4 ± 9.2 versus 89.6 ± 6.9) and higher leukocyte count ($600.0[300.0;121.5]$ versus $350.0[100.0;675.0]$). In infertile individuals using multivitamin and multimineral supplements, semen parameters were comparable to those in proven fertile individuals, except for spermatozoa concentration ($68.0[28.8;102.5]$ versus $96.5[49.0;144.2]$) and vitality (85.6 ± 9.1 versus 89.6 ± 6.9), which were significantly lower. **Conclusion:** In the infertile individuals assessed, the combined use of folic acid, β -carotene, α -tocoferol, ascorbic acid, selenium, copper and zinc significantly increased the percentage of morphologically normal spermatozoa without significantly increasing other semen parameters such as concentration, motility and vitality as compared with healthy proven fertile individuals.

Key words: Semen parameters. Male Infertility. Multivitamin. Multimineral. Micronutrients

Avaliação dos parâmetros seminais de indivíduos inférteis em uso de polivitamínico e polimineral.

Evaluation of Semen Parameters in Infertile Individuals Using Multivitamin and Multimineral Supplements.

1 INTRODUÇÃO

A infertilidade é doença definida pela inabilidade de um casal sexualmente ativo engravidar após 12 meses ou mais de coito regular não protegido (1,2). Aproximadamente 14% dos casais são inférteis (3) e, em 50% dos casos, o fator masculino está envolvido como problema primário ou em combinação com causa de origem feminina (4). A fertilidade é um fenômeno complexo e multifatorial que envolve a avaliação do casal (5).

Tradicionalmente, o diagnóstico de infertilidade masculina depende de uma avaliação dos parâmetros seminais, com ênfase na concentração, motilidade e morfologia dos espermatozóides (2). Embora não seja, isoladamente, considerada fundamental para diagnosticar infertilidade (6) os resultados da análise seminal é conduzida como parte da avaliação inicial dos casais inférteis (7).

O sêmen é um líquido biológico formado por plasma seminal, que contém produtos bioquímicos essenciais para os espermatozóides (8), como os antioxidantes (9,10). E por diferentes células, tais como, espermatozóide maduro e imaturo, células redondas em diferentes estágios da espermatogênese, leucócitos e células epiteliais (9). Destes diferentes tipos de células os leucócitos e os espermatozóides são as principais fontes de produção de espécies reativas de oxigênio - EROs, como por exemplo, íons de oxigênio, radicais livres e peróxidos (10). A produção de EROs pelos espermatozóides correlaciona inversamente com seu estado maduro e os espermatozóides imaturos são frequentemente caracterizados pela presença de excesso de resíduos citoplasmáticos (10). Os quais explicam a baixa qualidade de espermatozóides e a geração crescente de EROs (4,9,11).

O corpo humano tem desenvolvido algumas estratégias antioxidantes para proteger-se dos danos provocados pelas EROs permitindo o metabolismo oxidativo ocorrer sem danificar as células (10). O plasma seminal e o espermatozóide em si estão bem dotados de um

conjunto de proteção antioxidante (12,13), entre elas, enzimas antioxidantes, tais como superóxido dismutase e glutathione peroxidase, além de uma variedade de antioxidantes não enzimáticos, por exemplo, ácido ascórbico, α -tocoferol e vitamina A (9).

Os fatores ambientais e o estilo de vida relacionados com a infertilidade são de particular interesse, porque, ao contrário das causas genéticas, podem ser alvos de medidas preventivas ou curativas, entre estes fatores a nutrição é de fundamental importância, pois está envolvida na síntese de DNA (14)

Vários estudos fornecem evidências de que o uso de micronutrientes pode influenciar a qualidade seminal de homens inférteis. Porém esta relação permanece indefinida, já que há contradições entre os trabalhos publicados. Enquanto alguns autores encontraram melhora apenas na concentração espermática (15, 16, 17), ou na motilidade (18,19,20), outros verificaram aumento na concentração e na motilidade (21,22), assim como na motilidade e morfologia dos espermatozoides (23) de homens inférteis em uso isolado ou combinado de micronutrientes. Além disso, existem trabalhos que não observaram melhora em nenhum dos parâmetros seminais (24,25,26).

A significativa redução da atividade dos antioxidantes no plasma seminal de homens inférteis quando comparados com os homens férteis (27) e devido aos resultados controversos e a falta de estudos do uso combinado de ácido fólico, β -caroteno, α -tocoferol, ácido ascórbico, selênio, cobre e zinco relacionados aos parâmetros seminais de homens inférteis na população brasileira, a proposta deste estudo foi verificar se o uso de polivitamínico e polimineral, intervenção de baixa complexidade, melhoraria os parâmetros seminais e eventualmente a fertilidade destes indivíduos.

3 CASUÍSTICA E MÉTODO

Neste estudo retrospectivo foram analisados 57 casais com infertilidade acompanhados no ambulatório de esterilidade do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina/Botucatu - Universidade Estadual Paulista/UNESP no período de 2003 a 2007. Os casais foram encaminhados para a avaliação da infertilidade por ginecologista ou procura espontânea.

Duzentos e cinquenta e seis casais submeteram à avaliação inicial completa para a investigação de infertilidade. Dos 256 casais 159 homens apresentaram alteração seminal e foram orientados a tomar um complexo polivitamínico e polimineral. Apenas 57 indivíduos (1 com concentração inferior a 20 milhões de espermatozóides/ml, 3 com motilidade linear abaixo de 50%, 41 com 30% de formas anormais de espermatozóides, 5 com motilidade e morfologia anormais e 7 com alteração nos três parâmetros seminais), fizeram uso correto dos micronutrientes e foram incluídos neste estudo. Na avaliação inicial realizada para a investigação da infertilidade, além da alteração seminal observada em todos os indivíduos, 21% (12/57) dos casais apresentavam anovulação crônica e em 79% (45/57) não foram detectadas outras alterações.

Estes 57 indivíduos, que tinham idade entre 20 e 42 anos, usaram diariamente, por 90 dias consecutivos, um comprimido via oral após a refeição, de ácido fólico (5 mg) e um comprimido por via oral de um complexo polivitamínico e polimineral constituído de β -caroteno (pró-vitamina A) 10.000 UI, ácido ascórbico (vitamina C) 600mg, acetato de tocoferol (vitamina E) 200 UI, cobre (óxido de cobre) 1,0 mg, selênio (selênio glicina quelato) 100 mg e zinco (óxido de zinco) 40 mg. Estes indivíduos realizaram dois espermogramas, um antes e outro com 90 dias em uso dessas substâncias.

O grupo controle foi composto de 50 homens saudáveis, com idade variando de 20 a 48 anos, sem uso de polivitamínico e polimineral, com fertilidade comprovada e estabelecida com o casal, possuindo filho (a) com até dois anos de idade ou com gestação superior a 28 semanas. Nesses indivíduos foi possível realizar apenas um espermograma. Este grupo foi utilizado para verificar se os parâmetros seminais dos homens inférteis seriam diferentes (quando estes não estavam em uso) ou semelhantes (quando estes estavam em uso de micronutrientes) aos dos homens férteis.

Os critérios de exclusão para ambos os grupos foram: homens com idade superior a 50 anos, concentração igual ou inferior a cinco milhões de espermatozoides/ml, febre ou uso de medicamentos e/ou doenças nos últimos três meses que interferissem nos parâmetros seminais e uso de drogas ilícitas. Os homens em uso do complexo polivitamínico e polimineral que apresentaram epigastralgia, único efeito colateral observado, também foram excluídos deste estudo.

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual Paulista – Faculdade de Medicina de Botucatu, ofício 383/2006 – CEP, e todos os integrantes do estudo assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido conforme resolução nº 196/outubro/1996 – Conselho Nacional de Saúde e segundo as normas do Comitê de Ética e Pesquisa.

Para avaliação dos participantes foi realizado um questionário, no momento da coleta seminal, para obter informações gerais de identificação, saúde, história sexual, situação ocupacional e números de filhos e uso adequado dos medicamentos. Foi feita também uma análise dos prontuários dos casais inférteis para avaliar tempo e causa da infertilidade, e se fizeram de forma adequada o uso de polivitamínico e polimineral.

As amostras seminais dos indivíduos inférteis e férteis foram obtidas seguindo as orientações para a coleta do sêmen padronizado pelo Laboratório de Reprodução Humana do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu e as análises seminais foram realizadas por uma mesma equipe deste laboratório. Estas amostras foram coletadas em frascos estéreis, por masturbação, devidamente identificadas e mantidas na estufa a 37°C para total liquefação. Os parâmetros seminais foram analisados e classificados segundo os critérios de normalidade da Organização Mundial de Saúde (WHO, 1999), com adicional morfologia pelo critério de Kruger et al. (1986).

3.1 Análise Estatística

Entre os grupos, para a comparação estatística de idade, tempo de infertilidade, prole, tabagismo, tempo de abstinência, volume seminal, pH seminal, tempo de liquefação, motilidade espermática, morfologia pelo critério da OMS e de Kruger, utilizou-se o teste *t de Student* para populações dependentes e independentes e os resultados expressos em média e desvio padrão.

A concentração de espermatozóides, presença de leucócitos no sêmen e teste da peroxidase foram analisados utilizando-se o teste de Mann-Whitney (não paramétrico) para amostras independentes e o teste de Wilcoxon para amostras dependentes. Os resultados foram expressos em mediana com valores do 1º e 3º quartil.

Para todas as análises estatísticas utilizadas considerou-se um nível de significância de 5% ($p < 0,05$) e o programa utilizado foi o SAS versão 9.1.

4 RESULTADOS

Na tabela 1 estão representadas as características dos homens inférteis e férteis. Nossos resultados revelaram que a média das idades e do hábito tabagista dos homens inférteis são semelhantes ao grupo de férteis.

Tabela 1 - Características dos homens inférteis e dos férteis

Variável	Inférteis (n=57)	Férteis (n=50)	P valor
Idade (anos) ¹	31,0±5,6	30,3±6,5	0,55
Tabagismo (%) ¹	29,8	22,0	0,36
Prole ¹	0,07±0,32	1,8±1,8	<0,001
Tempo de infertilidade (anos) ¹	3,9±2,8	0,0±0,0	<0,001

1. Teste t de Student para populações independentes – valores expressos como média ± desvio-padrão

Na tabela 2 está representado os parâmetros seminais alterados dos indivíduos inférteis antes e em uso de polivitamínico e polimineral e dos homens saudáveis comprovadamente férteis.

Tabela 2. Parâmetros Seminais dos indivíduos inférteis antes e em uso de polivitamínico e polimineral e férteis.

Variáveis	Inférteis	Inférteis	Férteis
	Antes do uso (%/n)	Em uso (%/n)	(%)
Concentração > 20milhões/ml	49 (86%)	52 (91%)	50 (100%)
Motilidade A+B > 50%	24 (74%)	49 (86%)	49 (98%)
Morfologia > 30%	16 (28%)	26 (46%)	19 (38%)
Concentração e Motilidade e Morfologia normais	0 (0%)	13 (23%)	10 (20%)

Valores de acordo com a WHO (1999)

Com o uso de polivitamínico e polimineral houve um aumento na porcentagem de indivíduos com concentração, motilidade e morfologia normal, além do aumento no número dos indivíduos normozoospermicos.

A comparação dos parâmetros seminais dos indivíduos inférteis antes do uso e em uso de polivitamínico e polimineral por 90 dias com a dos homens férteis sem uso destas substâncias foram apresentadas na tabela 3.

Tabela 4 - Comparação dos parâmetros seminais de homens inférteis antes do uso, durante o uso de polivitamínico e polimineral por 90 dias e dos férteis sem uso destas substâncias

Variáveis	Inférteis Antes do uso (n=57)	Inférteis Em uso (n=57)	Férteis (n=50)	P valor		
				Inférteis	Inférteis	Inférteis
				Antes do uso X Inférteis Em uso	antes do uso X Férteis	em uso X Férteis
Volume (ml) ¹	3,9±1,6	3,9±2,1	3,0±1,4	0,93	0,0002*	0,008*
pH ¹	7,5±0,2	7,5±0,2	7,5±0,2	0,32	0,96	0,48
Liquefação (minutos) ¹	37,7±15,3	39,6±12,4	38,4±16,3	0,47	0,82	0,68
Concentração/ml ² (x 10 ⁶)	68,0[37,8;10 1,2]	68,0[28,8;1 02,5]	96,5[49,0;1 44,2]	0,48	0,037*	0,026*
Motilidade A+B (%) ¹	61,5±19,0	64,0±15,9	66,9±19,3	0,24	0,14	0,38
Critério da Morfologia de Kruger ¹ (%)	6,9±4,1	9,1±5,2	8,2±4,8	0,002*	0,13	0,33
Critério da Morfologia OMS ¹ (%)	18,3±9,6	22,6±11,8	20,9±9,4	0,006*	0,17	0,39
Vitalidade (%) ¹	85,4±9,2	85,6±9,1	89,6±6,9	0,90	0,011*	0,014*
Leucócitos ² (x 10 ³)	600,0[300,0; 121,5]	750,0[425, 0;1406,2]	350,0[100, 0;675,0]	0,21	0,004*	<0,001

1. Teste t de Student para populações independentes e dependentes – valores expressos como média \pm desvio-padrão
2. Teste de Mann-Whitney para populações independentes e Teste de Wilcoxon para populações dependentes – valores expressos como mediana [IQ_{25%};IQ_{75%}]

*p < 0,05

Nos indivíduos inférteis, o uso de polivitamínico e polimineral aumentou significativamente a morfologia tanto pelos critérios estabelecidos pela WHO (1992) como por Kruger et al. (1986) e não significativamente a motilidade linear dos espermatozóides. Os outros parâmetros dos homens inférteis se mantiveram quanto seus valores médios e medianos. Observou-se que as médias e as medianas de todos os parâmetros seminais analisados antes e em uso de micronutrientes nos indivíduos inférteis e férteis encontravam-se dentro dos valores de normalidade preconizados pela WHO, exceto para a morfologia espermática, que estavam abaixo de 14% (critérios de Kruger) e 30% (WHO).

Verificou-se que os homens inférteis antes do uso de micronutrientes quando comparados aos férteis apresentavam significativamente uma menor concentração de espermatozóides/ml e vitalidade além de uma maior contagem de leucócitos e volume espermático. Os parâmetros seminais dos indivíduos inférteis em uso de polivitamínico e polimineral foram comparáveis ao grupo de indivíduos comprovadamente férteis com exceção da concentração e vitalidade de espermatozóides que foram significativamente inferiores.

Em relação ao tempo de abstinência sexual no grupo de inférteis sem uso de micronutrientes foi observado uma variação de 1 a 14 dias ($4,9 \pm 2,2$); quando estes estavam em uso dessas substâncias foi de 2 a 10 dias e no grupo de homens férteis a variação ficou

entre 1 a 20 dias ($4,1 \pm 3,4$), não apresentando diferenças estatísticas significantes entre os grupos.

Dos 57 casais estudados 24,5% (14/57) conseguiram engravidar quando seus parceiros estavam em uso de polivitamínico e polimineral. Estes casais apresentavam tempo de infertilidade variando de três a oito anos e a média das idades das mulheres foi $27,4 \pm 5,7$ com idade mínima de 18 e máxima de 42 anos.

5 DISCUSSÃO

Na avaliação das características dos indivíduos inférteis com os saudáveis comprovadamente férteis verificamos que os grupos eram semelhantes em relação à idade e ao hábito tabagista. Essa semelhança foi pré-requisito básico para as comparações, já que na literatura, há relatos consistentes sobre a piora na qualidade seminal de forma progressiva em homens com exposição ao fumo (29) e com aumento da idade (30).

De acordo com os critérios preconizados pela WHO (2) verificamos que apenas 20% (10/50) dos homens férteis apresentaram todos os seus parâmetros seminais dentro da normalidade e que somente 38% tinham espermatozóides morfolologicamente normais. Enquanto os inférteis antes do uso de micronutriente mostraram pelo menos um parâmetro seminal anormal. É interessante observar que 86% (49/57) dos indivíduos inférteis antes do uso de polivitamínico e polimineral apresentaram concentração acima de 20 milhões de espermatozóides/ml, 74% (42/57) motilidade espermática linear superior a 50% e que 28% (16/57) tiveram morfologia dos espermatozóides normais. Quando estavam em uso dos micronutrientes a porcentagem de indivíduos aumentaram em relação à concentração (91%), motilidade (86%) e morfologia (46%) espermática.

Nossos resultados são coerentes aos descritos por Chia et al. (31) que verificaram que os 243 homens férteis do seu estudo tinham uma média de espermatozóides morfolologicamente normais abaixo dos valores de normalidade e por Pasqualotto et al. (32) onde observaram que 87% dos homens comprovadamente férteis e desejosos de realizar uma cirurgia de vasectomia apresentaram também valores de morfologia espermática inferiores aos da WHO (1999). Nallella et al. (4), encontraram uma significativa porcentagem de homens férteis com morfologia anormal de espermatozóides e de indivíduos inférteis com

concentração espermática normal ao compararem 56 homens com fertilidade comprovada com 91 doadores normais, 406 com investigação para infertilidade e 166 homens com fator de infertilidade masculina.

Ao compararmos os indivíduos inférteis antes do uso de polivitamínico com os férteis, verificamos que estes últimos apresentaram uma maior concentração e vitalidade espermática significativa. A motilidade e morfologia dos espermatozóides, apesar de serem superiores nos indivíduos férteis em relação aos inférteis sem uso de micronutrientes, não apresentou diferença significativa. A comparação dos parâmetros seminais entre inférteis em uso de micronutrientes e férteis em valores medianos à concentração espermática e valores médios à vitalidade manteve significativamente superior aos inférteis. A média da motilidade dos espermatozóides foi maior nos indivíduos férteis que nos inférteis, mas sem diferença significativa. Observou-se que apesar da média dos espermatozóides com morfologia normal para os critérios estabelecidos por WHO (1992) e Kruger et al. (1986) terem aumentado com o uso de polivitamínico e polimineral e serem superiores aos dos indivíduos férteis não foram observados diferenças significativas nestes parâmetros.

Uma hipótese, que justificaria tais diferenças nos grupos em relação à concentração e à vitalidade dos espermatozóides entre férteis e inférteis seria que os indivíduos inférteis possuem um número maior de espécies reativas de oxigênio no sêmen (11) as quais são conhecidas por serem indutores de apoptose em espermatozóides maduros (8) o que levaria a morte celular (33) e conseqüentemente uma diminuição na vitalidade e no número de espermatozóides.

O número elevado de leucócitos observado no sêmen dos homens inférteis pode também ter contribuído com a qualidade seminal inferior observada nesses indivíduos quando comparadas com os homens férteis, já que essas células são as principais formadoras de EROs no líquido seminal (9,10). Bezold et al. (34), verificaram que a prevalência de DST no sêmen

de indivíduos inférteis são semelhantes aos indivíduos com ou sem leucocitospermia e que a presença de DST assintomática em indivíduos inférteis estão associados com pobre qualidade seminal. Por outro lado, Muraro et al. (2007), em estudo realizado com 90 pacientes submetidos à triagem para infertilidade, apesar de observar aumento da concentração de espermatozóides com a presença de leucócitos, concluíram que estas células no sêmen podem não estar associadas com parâmetros anormais do espermograma.

O aumento de espermatozóides com formas normais nos indivíduos inférteis com uso de micronutrientes e a taxa de gestação de 25,4% indicam que a morfologia pode desempenhar um papel importante na fertilidade dos indivíduos inférteis, apesar dos resultados encontrados estarem abaixo dos valores de normalidade estipulados pela WHO (1999) e Kruger et al. (1986). O que foi observado por Nallella et al. (2006) que sugeriram que a morfologia em valores mais baixos que os preconizados pela WHO (1999) podem melhor discriminar indivíduos férteis de inférteis. Estes dados são coerentes com os de Chia et al. (1998) que observaram que a morfologia seria melhor preditor para a gravidez. E que a morfologia normal é uma característica essencial para a fecundação *in vivo* e fertilização *in vitro* (35). Entretanto, Guzick et al., (2001) ao avaliarem os parâmetros seminais de 765 casais inférteis e 696 férteis concluíram que os parâmetros seminais não são diagnósticos de fertilidade já que observaram uma sobreposição das características espermáticas em relação a concentração motilidade e morfologia entre estes indivíduos.

A melhora estatisticamente significativa observada na porcentagem de espermatozóides morfolologicamente normais e não significativa da motilidade espermática linear dos homens inférteis no nosso estudo, pode ser explicada devido ao uso de polivitamínico e polimineral por 90 dias. O uso de micronutriente com poder antioxidante pode ter atenuado a ação dos radicais livres, que alteram a membrana plasmática e o DNA espermático. O que levaria ao menor número de espermatozóides com formas anormais, e, conseqüentemente com uma

melhor motilidade. A redução do número de espermatozóides anormais poderia diminuir também a quantidade de EROs no sêmen, visto que estas células são uma das principais fontes destas substâncias. A provável redução da peroxidação lipídica dos ácidos graxos poliinsaturados, os quais são relevantes para fornecer à membrana plasmática a fluidez necessária para a fusão das membranas dos gametas, podem estar associados com a fertilização (36,37). Desta forma o sêmen com maior quantidade de antioxidante e menor de EROs reduziria os danos provocados pelos radicais livres nas biomoléculas. Estes resultados sugerem que o uso de micronutrientes com ação antioxidante, possivelmente interferem na qualidade seminal e eventualmente melhoraram a fertilidade dos homens inférteis. Entretanto outros mecanismos, não podem ser descartados.

Nossos resultados mostraram que o uso oral diário de ácido fólico (5 mg), β -caroteno (10.000 UI), ácido ascórbico (600mg), acetato de tocoferol (200 UI), cobre (1,0 mg), selênio (100 mg) e zinco (40 mg) por um período de 90 dias não melhorou estatisticamente a concentração e motilidade e sim a morfologia dos espermatozóides. Sendo compatíveis com os de Vezina et al. (1996) quanto a morfologia, mas diferem em relação a motilidade. Eles encontraram um significativo aumento na motilidade espermática e nos espermatozóides com formas normais de nove oligoastenoterozoospermicos que receberam 400mg/dia de α -tocoferol em combinação com selênio (100 μ g/d por um mês e 200 μ g/d por aproximadamente 6 meses).

Em relação à concentração espermática nossos resultados diferem dos estudos de Kodama et al. (1997) que avaliaram 36 homens inférteis usando por dois meses 200 mg de vitaminas C e E além de 400 mg de glutatona; Comhaire et al. (2000) que estudaram 27 homens inférteis em uso de acetilcisteína (600 mg) ou β -caroteno (300 mg) mais vitamina E (180 mg) durante 6 meses e dos estudos de Wong et al. (2002) onde 103 homens inférteis

fizeram uso por 26 semanas de ácido fólico (5 mg) e zinco (66 mg) que verificaram melhora apenas na concentração espermática.

Quanto à motilidade nossos estudos foram diferentes dos resultados encontrados por Suleiman et al. (1996), em seu estudo randomizado, duplo-cego, placebo controlado, com 110 astenozoospermicos tratados com vitamina E oral (300 mg duas vezes ao dia) por 6 meses, que observaram melhora significativa da motilidade dos espermatozoides em 60% dos pacientes. Scott et al. (1998) em um estudo realizado com oligoastenoterazoospermicos e inférteis utilizando selênio, vitaminas A, E e C por três meses e Keskes et al., (2003) após a suplementação com vitamina E (400mg) e selênio (225µg) por três meses em grupo de férteis e inférteis também verificaram melhora na motilidade dos espermatozóiide.

Nossas observações também diferem dos autores que verificaram melhora na concentração e na motilidade simultaneamente como Omu et al. (1998) que avaliaram o sêmen de 100 astezoospermicos em uso de 250 mg de zinco por três meses e Eskenasi et al. (2005) ao compararem o sêmen de 97 homens saudáveis com suplementação de zinco, folato, vitamina C, E e β-caroteno.

Kessopoulou et al. (1995) com 30 homens inférteis usando por três meses vitamina E (600 mg); Moilanen e Hovatta (1995) que utilizou vitamina E em 15 homens inférteis por três semanas; Iwanier e Zachara (1995) que suplementaram 33 homens inférteis com 200 µg de selênio e Rolf et al. (1999) que utilizaram 1000 mg de vitamina C e 800 mg de vitamina E em 31 astenozoospermicos por 56 dias que não encontraram melhora estatística em nenhum dos três parâmetros seminais.

As divergências dos resultados entre os diferentes estudos podem se dever, em parte: ao tempo de uso dos micronutrientes, que em alguns trabalhos foi inferior ao estipulado para a espermatogênese, o que provavelmente não mostra o real efeito dos micronutrientes nos parâmetros seminais justificando parte das diferenças encontradas; ao uso isolado de

micronutriente em alguns trabalhos e, em outros, o uso combinado de duas ou mais substâncias; ao delineamento do estudo, enquanto alguns trabalhos foram prospectivos e/ou duplo cego e/ou randomizado e/ou placebo controlado outros foram retrospectivo; a variações nas características populacionais; ao número de participantes envolvido nos trabalhos e a subjetividade inerente à análise seminal.

A avaliação dos parâmetros seminais utilizados em nosso estudo foi a análise clássica de rotina por meio de avaliações microscópicas padronizadas pela OMS e analisadas por uma mesma equipe, na tentativa de diminuir a subjetividade na análise espermática. Apesar de a análise seminal não ser considerado o parâmetro ideal para predizer a fertilidade ela continua sendo utilizada na prática clínica.

O poder estatístico da nossa casuística de 60% limita a interpretação dos nossos dados. Poderíamos justificar o número de casos pelo pudor ou constrangimento da coleta do sêmen, dificuldade em seguir o tratamento por 90 dias e não continuidade do mesmo, gravidez durante o uso de micronutrientes e ao desinteresse por parte dos indivíduos do grupo controle que já tinham sua fertilidade comprovada.

A abstinência sexual antes da realização do espermograma apresentou ampla variabilidade nos indivíduos inférteis antes e com uso de polivitamínico e polimineral assim como nos homens férteis. Embora a mediana do tempo de abstinência se encontrar dentro dos valores preconizados pela WHO (1999), possivelmente esse dado possa interferir na análise dos resultados, já que não foi possível realizar o espermograma com o período de abstinência de dois a três dias. Um maior período de abstinência, em homens normozoospermicos, leva a um aumento na concentração espermática e no volume seminal, porém a qualidade espermática sofre deterioração, havendo diminuição na porcentagem da motilidade (38) e no número de espermatozoides morfologicamente normais; (39). Levitas et al. (2005) demonstraram que a deterioração dos parâmetros seminais está inversamente relacionada ao

período de abstinência sexual e recomendaram que a coleta de sêmen em indivíduos férteis não deveria ser realizada por um período maior que dez dias e que nesses homens, a melhor amostra poderia ser coletada após um dia de abstinência sexual. Estes dados podem explicar, em parte, o alto número de indivíduos com espermatozóides morfolologicamente anormais em ambos os grupos deste estudo e, no grupo de inférteis, indivíduos com uma alta concentração de espermatozóides por ml. Podemos inferir também que, apesar do tempo de abstinência influenciar na qualidade seminal, provavelmente não está relacionado com a fertilidade, já que o grupo de homens comprovadamente férteis foi semelhante ao grupo de homens inférteis em relação ao tempo de abstinência sexual.

O uso combinado de ácido fólico, β -caroteno, α -tocoferol, ácido ascórbico, selênio, cobre e zinco no presente estudo aumenta significativamente a porcentagem de espermatozóides morfolologicamente normais dos homens inférteis. Não houve melhora estatística significativa de outros parâmetros seminais como concentração, motilidade e vitalidade. Os parâmetros seminais dos indivíduos inférteis mesmo com uso de micronutrientes são inferiores quanto a concentração e vitalidade espermática em relação aos indivíduos saudáveis comprovadamente férteis.

REFERÊNCIAS

1. AMERICAN SOCIETY FOR REPRODUCTIVE MEDICINE, Birmingham, Alabama. Definitions of infertility and recurrent pregnancy loss. *Fertility and Sterility*, 89(6), 2008.
2. WORLD HEALTH ORGANIZATION – WHO. Laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction. 4.ed. Cambridge: Cambridge University Press, 1999.
3. WONG, W. Y.; THOMAS, C. M. G.; MERKUS, J. M. W. M.; ZIELHUIS, G. A.; STEEGERS-THEUNISSEN, R. P. M. Male factor subfertility: possible causes and the impact of nutritional factors. *Fertility and Sterility*, 73, p. 435-442, 2000.
4. NALLELLA, K. P.; SHARMA, R. K.; NABIL, A.; AGARWAL, A. Significance of sperm characteristics in the evaluation of male infertility. *Fertility and Sterility*, 85(3), p. 629-634, 2006.
5. PASQUALOTTO, E. B.; PASQUALOTTO, F. F. Espermograma e testes de função espermática. *Femina*, v. 34, p. 92-98, 2006a.
6. GUZICK, D.S.; OVERSTREET, J.W.; FACTOR-LITVAK, P.; BRAZIL, C.K.; NAKAJIMA, S.T.; COUTIFARIS, C. et al. Sperm morphology, motility, and concentration in fertile and infertile men. *N Engl J Med.*, 345(19), p.1388-393, 2001.
7. NATIONAL INSTITUTE FOR CLINICAL EXCELLENCE (NICE). Fertility: assessment and treatment for people with fertility problems. Clinical Guidelines, February 2004.
8. MURARO, F.; HENNEMANN, T. C.; ANZOLCH, K. J.; OLIVEIRA, O. L. M. Efeito da leucocitospermia na análise do sêmen. *RBAC*, 39(1), p. 47-50, 2007.
9. AGARWAL A.; MAKKER K.; SHARMA S. Clinical relevance of oxidative stress in male factor infertility: an update. *AJRI*, 59, p. 2-11, 2008,.

-
10. TREMELLEN, K. Oxidative stress and male infertility- a clinical perspective. *Human Reproduction Update*, 14(3), p.243-288, 2008.
 11. PASQUALOTTO F.F.; SHARMA R.K.; NELSON D.R.; THOMAS A.J.; AGARWAL A. Relationship between oxidative stress, semen characteristics, and clinical diagnosis in men undergoing infertility investigation. *Fertility and Sterility*, 73(3), p. 459-64, 2000.
 12. FUJII, J.; MATSUKI, S.; ISHII T. Cooperative function of antioxidant and redox systems against oxidative stress in male reproductive tissues. *Asian J Androl.*, 5, 231-242, 2003.
 13. GARRIDO, N.; MESEGUER M.; SIMON, C., PELLICER, A.; REMOHI, J. Pro-oxidative and anti-oxidativo imbalance in human semen and its relation with male fertility. *Asian J Androl.*, 6, p.59-65, 2004.
 14. EBISCH, I. M. W. et al. The importance of folate, zinc and antioxidants in the pathogenesis and prevention of subfertility. *Human Reproduction Update*, 13(2), p. 163-174, 2007.
 15. KODAMA, H.; TAMAGUCHI, R.; FUKUDA, J. et al. Increased oxidative deoxiribonucleic acid damage in the spermatozoa of infertile male patients. *Fertility and Sterility*, 68, p. 519-524, 1997.
 16. COMHAIRE, F. H.; CHRISTOPHE, A. B.; ZALATA, A. A.; DHOOGHE, W.S.; MAHMOUD, A.M.A.; DEPUYDT, C.E. The effects of combined conventional treatment, oral antioxidants and essential fatty acids on sperm biology in subfertil men. *Prostaglandins Leucotrienes and essential Fatty Acids*, 63, p. 159-165, 2000.
-

-
17. WONG, W. Y.; MERKUS, J. M. W. M.; THOMAS, C. M. G.; MENKVELD, R.; ZIELHUIS, G. A.; STEEGERS-THEUNISSEN, R. P. M. Effects of folic acid and zinc sulfate on male factor subfertility: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *Fertility and Sterility*, 77, p. 491-498, 2002.
 18. SULEIMAN, S. A.; ALI, M. E.; ZAKI, Z. M. et al. Lipid peroxidation and human sperm motility: protective role of vitamin E. *Journal of Andrology*, 17, p. 530-537, 1996.
 19. SCOTT, R.; MACPHERSON, A.; YATES, R. W. et al. The effect of oral selenium supplementation on human sperm motility. *British Journal of Urology*, 82, p. 76-80, 1998.
 20. KESKES-AMMAR, L.; FEKI-CHAKROUN, N.; REBAI, T. et al. Sperm oxidative stress and the effect of an oral vitamin E and selenium supplement on semen quality in infertility men. *Archives of Andrology*, 49, p. 83-94, 2003.
 21. TIKKIWAL, M.; AJMERA, R. L.; MATHUR, N. K. Effect of zinc administration on seminal zinc and fertility of oligospermic males. *Indian J Physiol Pharmacol*, 31, p. 30-34, 1987.
 22. OMU, A. E.; DASHTI, H.; AL-OTHMAN, S. Treatment of asthenozoospermia with zinc sulfate: andrological, immunological and obstetric outcome. *European Journal Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, 79, p. 179-184, 1998.
 23. VEZINA, D.; MAUFFETTE, F.; ROBERTS, K. D. et al. Selenium-vitamin E supplementation in infertile men. Effects on semen parameters and micronutrient levels and distribution. *Biological Trace Element Research*, 53, p. 65-83, 1996.
-

-
24. KESSOPOULOU, E.; POWERS, H. J.; SHARMA, K. K. et al. A double-blind randomized placebo crossover controlled trial using the antioxidant vitamin E to treat reactive oxygen species associated male infertility. *Fertility and Sterility*, 64, p. 825-831, 1995.
 25. MOILANEN, J.; HOVATTA, O. Excretion of alpha-tocopherol into human seminal plasma after oral administration. *Andrologia*, 27, p. 133-136, 1995.
 26. IWANIER, K.; ZACHARA, B. A. Selenium supplementation enhances the element concentration in blood and seminal fluid but does not change the spermatozoal quality characteristics in subfertile men. *Journal of Andrology*, 16, p. 441-447, 1995.
 27. KAO, S.; CHAO, H.C.; CHEN, H.; HWANG, T.I.S.; LIAO, T., WEI, Y. Increase of oxidative stress in human sperm with lower motility. *Fertility and Sterility*, 89(5), p.1183-1190, 2008.
 28. KRUGER, T. F.; MENKVELD, R.; STANDER, F. S.; LOMBARD, C. J. J. P. Sperm morphologic features as a prognostic factor in in vitro fertilization. *Fertility and Sterility*, 46(6), p. 203-210, 1986.
 29. TRUMMER, H.; HABERMANN, H.; HAAS, J.; PUMMER, K. The impact of cigarette smoking on human semen parameters and hormones. *Hum Reprod*, 17(6), p. 1554, 2002.
 30. PASQUALOTTO, F. F.; SILVA, C. O.; UMEZU, F. M.; PASQUALOTTO, E. B.; SALVADOR, M.; AGARWAL, A. Relationship between sexual abstinence period and oxidative stress in infertile men. *Fertility and Sterility*, 84 (1), p. S458, 2005.
 31. CHIA S. E.; TAY S. K.; LIM S.T. What constitutes a normal seminal analysis? Semen parameters of 243 fertile men. *Human reproduction*, 13, p. 3394-3398, 1998.
-

-
32. PASQUALOTTO, F. F.; SOBREIRO, B. P.; HALLAK, J.; ATHAYDE, K. S.; PASQUALOTTO, E. B.; LUCON, A. M. High percentage of abnormal semen parameters in a prevasectomy population. *Fertility and Sterility*, 85(4), p. 954-60, 2006b.
 33. VILLEGAS J.; KEHR K., SOTO L.; HENKEL R.; MISKA W.; SÁNCHEZ R. Reactive oxygen species induce reversible capacitation in human spermatozoa. *Andrologia*, 35, p.227-232, 2003.
 34. BEZOLD G.; POLITCH J. A.; KIVIAT, N. B.; KUYPERS J. M. WOLFF H.; ANDERSON D. J. Prevalence of sexually transmissible pathogens in semen from asymptomatic male infertility patients with and without leukocytospermia. *Fertility and Sterility*, 87(5), p.1087-1097, 2007.
 35. COETZEE K.; KRUGER T. F.; LOMBARD C. J. Predictive value of normal sperm morphology: a structured literatura review. *Human reproduction Update*, 4, p. 73-82, 1998.
 36. HENKEL R.; MAA G.; HAJIMOHOMMAD M.; MENKVELD R.; STALF T.; VILLEGAS J.; SÁNCHEZ R.; KRUGER T. F.; SCHILL W. B. Urogenital inflammation: changes of leucocytes and ROS. *Andrologia*, 35, p. 309-311, 2003.
 37. KRAUSE W.; BOHRING C.; GUETH A.; HORSTER S.; KRISP A.; SKRZYPEK J. Cellular and biochemical markers in semen indicating male accessory gland inflammation. *Andrologia*, 35, p. 279-282, 2003.
 38. ELZANATY, S.; MALM, J.; GIWERCMAN, A. Duration of sexual abstinence: epididymal and accessory sex gland secretions and their relationship to sperm motility. *Human Reproduction*, 20(1), p. 221-225, 2005.
-

39. LEVITAS, E.; LUNENFELD, E.; WEISS, N.; FRIGER, M.; HAR-VARDI, I.; KOIFMAN, A. et al. Relationship between the duration of sexual abstinence and semen quality: analysis of 9,489 semen samples. *Fertility and Sterility*, 83(6), p. 1680-1686, 2005.
-