



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS

Ane Francyne Costa

**Avaliação da qualidade do sêmen humano utilizando métodos de análise
padrão e coadjuvantes**

Florianópolis
2023

Ane Francyne Costa

**Avaliação da qualidade do sêmen humano utilizando métodos de análise
padrão e coadjuvantes**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora em Ciências Médicas.

Orientador: Prof.(a) Alexandre Sherlley Casimiro Onofre, Dr.

Coorientadora: Prof.(a) Fabiana Botelho de Miranda Onofre, Dra.

Florianópolis

2023

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Costa, Ane Francyne

Avaliação da qualidade do sêmen humano utilizando métodos de análise padrão e coadjuvantes / Ane Francyne Costa ; orientador, Alexandre Sherlley Casimiro Onofre, coorientador, Fabiana Botelho de Miranda Onofre, 2023.
142 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós Graduação em Ciências Médicas-Novo, Florianópolis, 2023.

Inclui referências.

1. Ciências Médicas-Novo. 2. Infertilidade masculina. 3. Análise de sêmen. 4. Dano à integridade da cromatina. 5. Garantia da qualidade para concentração de espermatozoides. I. Onofre, Alexandre Sherlley Casimiro . II. Onofre, Fabiana Botelho de Miranda. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas-Novo. IV. Título.

Ane Francyne Costa

**Avaliação da qualidade do sêmen humano utilizando métodos de análise padrão e
coadjuvantes**

O presente trabalho em nível de Doutorado foi avaliado e aprovado, em 06 de fevereiro de 2023, pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. (a) Rosemeri Maurici da Silva Dr. (a)
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Eduardo Monguilhott Dalmarco, Dr.
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.(a) Karina Braga Gomes Borges, Dr.(a)
Universidade Federal de Minas Gerais

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de Doutora em Ciências Médicas.

Prof.(a) Katia Lin, Dr.(a)
Coordenação do Programa de Pós-Graduação

Prof Alexandre Sherlley Casimiro Onofre, Dr.
Orientador

Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, 2023.

Dedico essa tese à minha família, aos meus professores, aos meus amigos e principalmente, aos participantes do estudo que contribuíram com os resultados deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha família, minha mãe Márcia Costa, meu pai Dauri Aristote Costa, meu irmão André Felipe Costa e Costa e minha avó Maria Lair Costa. Serei eternamente grata por todo o amor, apoio e incentivo durante os anos necessários para realizar meus estudos.

Ao meu orientador, professor Dr. Alexandre Sherlley Casimiro Onofre, por ter acreditado em mim e por ter compartilhado comigo sua sabedoria ao longo dos anos. Seus ensinamentos certamente me moldaram para me tornar uma pessoa mais rica espiritualmente.

À minha coorientadora, professora Dra. Fabiana Botelho de Miranda Onofre, por sua dedicação e competência. Agradeço por ter me acolhido durante meu mestrado e por ter aberto portas para que eu pudesse atuar em uma área do conhecimento que amo tanto hoje.

Agradeço às minhas amigas Mariana Goveia Melo Ribeiro e Najara Oliveira da Rosa, por compartilhar comigo as alegrias e por sempre estender a mão nos momentos difíceis. Aos amigos e aos professores que tive o prazer de conhecer ao longo dos anos.

Agradeço ao Farmacêutico Lucas Valentim Silveira, que atuou como aluno de iniciação científica no Laboratório de Citologia da UFSC durante sua graduação e foi essencial para a execução do trabalho, sempre ajudando no contato com os participantes e na execução dos experimentos. Obrigada por sempre trazer alegria e disposição ao laboratório. Agradeço à farmacêutica Ana Leticia Müller, que em seu trabalho de conclusão de curso elaborou um rico acervo fotográfico com as amostras analisadas no projeto e disponibilizou imagens para a elaboração dessa tese.

Agradeço à cada um dos participantes do estudo, pois apesar de todo meu empenho nada seria possível sem eles. Ao Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Universitário Professor Polydoro Ernani de São Thiago, que forneceu espaço para a coleta das amostras. À Dra. Lia Karina Volpato, que aceitou fazer parte da pesquisa e fornecer encaminhamentos aos participantes com resultados alterados no espermograma. Por fim, agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da UFSC, pela oportunidade de executar essa pesquisa e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro durante os quatro anos de doutorado.

“O cientista em seu laboratório não é um mero técnico: é também uma criança diante de fenômenos naturais que o impressionam como se fossem contos de fadas”.

Marie Curie

RESUMO

Introdução: Problemas de fertilidade vem se tornando cada vez mais frequentes entre casais no mundo e sabe-se que cerca de um terço dos casos de infertilidade tem um componente masculino como causa. O ponto de partida da investigação de infertilidade masculina é a análise do sêmen. Testes de rotina como o espermograma, bem como testes complementares, podem ser aplicados para investigar a infertilidade masculina. **Objetivos:** Avaliar a relação entre hábitos de vida e qualidade do sêmen, estudar a influência das condições de armazenamento sobre os parâmetros espermáticos e avaliar a precisão e a acurácia do hemocitômetro de Neubauer e da câmara de Makler como métodos de determinação de concentração de espermatozoides. **Método:** Foi realizado um estudo transversal entre abril e setembro de 2022 envolvendo a investigação de parâmetros do sêmen e hábitos de vida de alunos e colaboradores da Universidade Federal de Santa Catarina. Os participantes responderam questionários sobre seus hábitos de vida, percepção de estresse e eventos de vida estressantes. Amostras de sêmen foram coletadas após abstinência sexual de 2 a 7 dias. Após liquefação, parâmetros do espermograma e análise de dano à integridade da cromatina espermática com coloração de azul de toluidina foram realizados. Os parâmetros de concentração, vitalidade e motilidade foram reanalisados após armazenamento das amostras em temperaturas de 4°C e 37°C por três horas. O hemocitômetro de Neubauer e a câmara de Makler foram comparados para determinação de concentração de esferas de látex e de amostras do estudo. **Resultados:** Ao todo, 192 participantes foram incluídos na análise. A frequência de alteração dos parâmetros seminais foi de 21,9%. O dano à integridade da cromatina apresentou correlação negativa com os parâmetros de vitalidade, motilidade progressiva, e morfologia normal, mas não com os parâmetros de volume, concentração ou contagem total de espermatozoides. A análise de hábitos de vida e qualidade do sêmen demonstrou que cirurgia pélvica, depressão, frequência do uso do telefone celular, varicocele e relato de sintomas graves ou hospitalização por COVID-19 foram associados com prejuízo de parâmetros espermáticos. Maior dano à integridade da cromatina espermática foi associada a redução de concentração de espermatozoides, enquanto amostras com menor dano da cromatina apresentaram concentração estável após três horas de armazenamento tanto a 4°C como a 37°C. As estimativas no hemocitômetro de Neubauer foram mais precisas e acuradas do que na câmara de Makler. A concordância entre as câmaras foi ruim para valores de concentração espermática inferiores a $40,0 \times 10^6/\text{ml}$. **Conclusão:** Alguns aspectos de hábitos de vida podem ser responsáveis por levar ao prejuízo de parâmetros espermáticos. Além de testes de rotina, a avaliação de dano à integridade da cromatina com azul de toluidina pode ser um método alternativo simples e barato para avaliar a capacidade funcional de espermatozoides. Por fim, a câmara de Makler é um substituto ruim para determinar a concentração espermática e as medições apresentam maior precisão e acurácia com o hemocitômetro de Neubauer.

Palavras-chave: Infertilidade masculina; Análise de sêmen; Dano à integridade da cromatina; Hemocitômetro de Neubauer; Câmara de Makler.

ABSTRACT

Introduction: Fertility problems are becoming more common among couples worldwide and about a third of infertility cases have a male component as the cause. The starting point of male infertility investigation is semen analysis. Routine tests such as the spermogram, as well as additional tests can be applied to investigate male infertility. **Objectives:** Evaluate the relationship between life habits and semen quality, study the influence of storage conditions on sperm parameters and evaluate the precision and accuracy of the Neubauer hemocytometer and the Makler chamber as sperm concentration methods. **Methods:** A cross-section study was performed between April and September 2022 involving the investigation of semen parameters and lifestyle habits of students and collaborators of the Federal University of Santa Catarina. Participants answered questionnaires about their lifestyle habits, perception of stress and stressful life events. Semen samples were collected after sexual abstinence for 2 to 7 days. After liquefaction, spermogram parameters and analysis of damage to sperm chromatin integrity with toluidine blue staining were performed. The concentration, vitality and motility parameters were reassessed after storing samples at temperatures of 4°C and 37°C for three hours. The Neubauer hemocytometer and the Makler chamber were compared to determine the concentration of latex beads and study samples. **Results:** In all, 192 participants were included in the analysis. Prevalence of changes in seminal parameters was 21.9%. Damage to chromatin integrity of was negatively correlated with the parameters of vitality, progressive motility, and normal morphology, but not with parameters of volume, concentration, or total sperm count. The analysis of lifestyle habits and semen quality showed that pelvic surgery, depression, frequency of cell phone use, varicocele, and reporting of severe symptoms or hospitalization for COVID-19 were associated with impairment of sperm parameters. Greater damage to sperm chromatin integrity was associated with reduced sperm concentration, while samples with less chromatin damage showed stable concentration after three hours of storage both at 4°C and 37°C. The estimates in the Neubauer hemocytometer were more precise and accurate than in the Makler chamber. The agreement chambers were poor form sperm concentration values below $40.0 \times 10^6/\text{ml}$. **Conclusion:** Some aspects of life habits may be responsible for impairing sperm parameters. In addition to routine tests, the assessment of damage to chromatin integrity with toluidine blue can be a simple and inexpensive alternative method to assess the functional capacity of spermatozoa. Finally, the Makler chamber is a poor substitute for determining sperm concentration and measurements are more precise and accurate with the Neubauer hemocytometer.

Keywords: Male infertility; Semen analysis; Damage to chromatin integrity; Neubauer hemocytometer; Makler chamber.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Espermatogênese	21
Figura 2 – Número de centros de reprodução humana assistida no Brasil por unidade federativa.....	25
Figura 3 – Testes laboratoriais em amostras de sêmen.....	34
Figura 4 – Determinação de vitalidade.....	49
Figura 5 – Classificação de anormalidades morfológicas de espermatozoides	50
Figura 6 – Espermatozoides corados pela coloração de Papanicolaou	51
Figura 7 – Espermatozoides corados pela coloração de azul de toluidina.....	52
Figura 8 – Fluxograma do estudo.....	56
Figura 9 – Estado de origem dos participantes do estudo	61
Figura 10 – Análise de amostras após a liquefação e três horas após armazenamento em estufa e geladeira	82
Figura 11 – Hemocitômetro de Neubauer	92
Figura 12 – Câmara de Makler.....	94
Figura 13 – Contagem de esferas de látex	96
Figura 14 – Diagrama de box e whiskers com as diferenças de distribuição das medições feitas com o hemocitômetro de Neubauer e com a câmara de Makler para determinação de concentração de látex.....	101
Figura 15 – Gráficos de Bland e Altman para determinação de concentração de espermatozoides pelo hemocitômetro de Neubauer e pela câmara de Makler.....	103
Figura 16 – Análise de regressão linear mostrando viés proporcional entre a estimativa de concentração de espermatozoides pelo hemocitômetro de Neubauer e pela câmara de Makler.....	104
Figura 17 – Gráficos de Bland e Altman para determinação de diferentes subdivisões de concentração de espermatozoides de pelo hemocitômetro de Neubauer e pela câmara de Makler.....	106

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Distribuição de resultados de exame de sêmen de homens em casais que iniciaram uma gravidez natural dentro de um ano após início de relação sexual desprotegida.....	32
Quadro 2 – Determinação da diluição adequada com base no número de espermatozoides por campo	93

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Resultados da análise do sêmen	58
Tabela 2 – Classificação dos parâmetros seminais em relação limites de referência estabelecidos pela Organização Mundial da Saúde.....	59
Tabela 3 – Correlações entre os parâmetros espermáticos	60
Tabela 4 – País de origem dos participantes do estudo.....	61
Tabela 5 – Características da população do estudo (continua).....	62
Tabela 6 – Distribuição de médias dos parâmetros seminais entre características da população do estudo (continua)	65
Tabela 7 – Análises de regressão linear entre parâmetros do sêmen e estresse percebido.....	69
Tabela 8 – Análises de regressão linear entre parâmetros do sêmen e eventos de vida estressantes	69
Tabela 9 – Análise de concentração após liquefação e após três horas de armazenamento em estufa e geladeira por percentil inferior e superior de parâmetros do sêmen.....	84
Tabela 10 – Análise de vitalidade após liquefação e após três horas de armazenamento em estufa e geladeira por percentil inferior e superior de parâmetros do sêmen.....	85
Tabela 11 – Análise de motilidade progressiva após liquefação e após três horas de armazenamento em estufa e geladeira por percentil inferior e superior de parâmetros do sêmen.....	86
Tabela 12 – Comparação de contagens de esferas de látex obtidas no hemocítômetro de Neubauer e na câmara de Makler	99
Tabela 13 – Comparação da concentração de espermatozoides (10^6 /ml) obtida pelo hemocítômetro de Neubauer e pela câmara de Makler.....	102
Tabela 14 – Comparação de diferentes faixas de concentração de espermatozoides obtidas pelo hemocítômetro de Neubauer e pela câmara de Makler	104

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µl	Microlitro
10 ⁶ /ml	Milhões por ml
A	EspERMatozoides com Motilidade Progressiva Rápida
B	EspERMatozoides com Motilidade Progressiva Lenta
C	EspERMatozoides com Motilidade Não Progressiva
D	EspERMatozoides Imóveis
A+B	Motilidade Progressiva
A+B+C	Motilidade Total
CASA	Análise de Sêmen Assistida por Computador
CEPSH	Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos
CM	Câmara de Makler
CNES	Cadastro Nacional de Estabelecimentos de Saúde
COVID-19	Doença do Coronavírus de 2019
CV	Coeficiente de Variação
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DP	Desvio Padrão
EBSERH	Empresa Brasileira de Serviços Hospitalares
ECA-2	Enzima Conversora de Angiotensina 2
EROs	EspÉcies Reativas de Oxigênio
FITC-PSA	Teste de Aglutinina <i>Pisum sativum</i> Marcada com Isotiocianato de Fluoresceína
FIV	Fertilização <i>in vitro</i>
FSH	Hormônio Folículo Estimulante
GnRH	Hormônio liberador de gonadotrofinas
HHA	Eixo Hipotálamo-Hipófise-Adrenal
HHG	Eixo Hipotálamo-Hipófise-Gonadal
HN	Hemocitômetro de Neubauer
HU	Hospital Universitário
IBGE	Instituto Nacional de Geografia e Estatística
IC	Intervalo de Confiança
IMC	Índice de Massa Corpórea

IST	Infeção Sexualmente Transmissível
kg/m ²	Quilogramas por Metro Quadrado
LACIT	Laboratório de Citologia Clínica
LH	Hormônio Luteinizante
MC – CP	Contagem na Câmara de Makler de Suspensão de Esferas de Látex Diluída na Proporção de 1:2 com Crioprotetor
MC – H ₂ O	Contagem na Câmara de Makler de Suspensão de Esferas de Látex Diluída na Proporção de 1:2 com Água Destilada
MC – ND	Contagem na Câmara de Makler de Suspensão de Esferas de Látex Não Diluída
MC – SP	Contagem na Câmara de Makler de Suspensão de Esferas de Látex Diluída na Proporção de 1:2 com Plasma Seminal
ml	Mililitro
n	Número de Participantes
NaHCO ₃	Bicarbonato de Sódio
NR3C1	Receptor de Glicocorticoides Subfamília 3, Grupo C, Membro 1
OMS	Organização Mundial da Saúde
PNDS	Pesquisa Nacional de Demografia e Saúde
RNA	Ácido Ribonucleico
SARS-Cov-2	Coronavírus da Síndrome Respiratória Aguda Grave 2
SCD	Teste de Dispersão Espermática
SCSA	Teste de Estrutura da Cromatina Espermática
SUS	Sistema Único de Saúde
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TDAH	Transtorno de Déficit de Atenção com Hiperatividade
TFT	Taxas de Fecundidade totais
TUNEL	Método de Marcação de "nicks" por dUTP-Biotina Mediada por Desoxinucleotidil Transferase Terminal
UFSC	Universidade Federal de Santa Catarina
USB	Unidade Básica de Saúde
VR	Viés Relativo

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL	18
2	REFERENCIAL TEÓRICO	20
2.1	ESPERMATOGÊNESE.....	20
2.2	INFERTILIDADE	22
2.2.1	Aspectos epidemiológicos	22
2.2.2	Aspectos etiológicos da infertilidade masculina	26
2.2.2.1	<i>Estresse psicológico</i>	27
2.2.2.2	<i>COVID-19</i>	29
2.2.3	Abordagem diagnóstica de infertilidade masculina	30
3	JUSTIFICATIVA	37
4	HIPÓTESES	38
4.1	HIPÓTESES NULAS.....	38
4.2	HIPÓTESES ALTERNATIVAS.....	38
5	OBJETIVOS	39
5.1	OBJETIVO GERAL	39
5.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	39
CAPÍTULO 1. PARÂMETROS SEMINAIS DA POPULAÇÃO DE ESTUDO E RELAÇÃO COM HÁBITOS DE VIDA		40
1	INTRODUÇÃO	41
2	MÉTODOS	42
2.1	POPULAÇÃO.....	42
2.2	CRITÉRIOS DE INCLUSÃO	43
2.3	CRITÉRIOS DE NÃO INCLUSÃO.....	43
2.4	COLETA E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS	43
2.5	QUESTIONÁRIOS	44
2.5.1	Hábitos de vida	44
2.5.2	Escala de estresse percebido	44
2.5.3	Inventário de eventos de vida estressantes	45
2.6	EXAME MACROSCÓPICO	45
2.6.1	Volume	45
2.6.2	Tempo de liquefação	45
2.6.3	Aspecto e cor	46

2.6.4	pH	46
2.6.5	Viscosidade	47
2.7	EXAME MICROSCÓPICO	47
2.7.1	Concentração	47
2.7.2	Contagem total	47
2.7.3	Motilidade	47
2.7.4	Vitalidade	48
2.7.5	Morfologia	49
2.7.6	Diferenciação de células redondas	51
2.8	DANO À INTEGRIDADE DA CROMATINA	51
2.9	ANÁLISE ESTATÍSTICA	53
2.9.1	Cálculo amostral	53
3	RESULTADOS	55
3.1	POPULAÇÃO	55
3.2	ESPERMOGRAMA	56
3.3	RELAÇÃO ENTRE QUALIDADE DO SÊMEN E HÁBITOS DE VIDA	61
4	DISCUSSÃO	70
5	CONCLUSÃO	78
CAPÍTULO 2. ANÁLISE DE SÊMEN APÓS TRÊS HORAS EM DIFERENTES CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO		79
1	INTRODUÇÃO	80
2	MÉTODOS	80
2.1	INFLUÊNCIA DO ARMAZENAMENTO POR TRÊS HORAS DO SÊMEN A 4°C E A 37°C SOBRE A CONCENTRAÇÃO, MOTILIDADE E VITALIDADE ESPERMÁTICA	80
2.2	ANÁLISE ESTATÍSTICA	81
3	RESULTADOS	81
4	DISCUSSÃO	87
5	CONCLUSÃO	88
CAPÍTULO 3. COMPARAÇÃO ENTRE HEMOCITÔMETRO DE NEUBAUER E CÂMARA DE MAKLER		90
1	INTRODUÇÃO	91
2	MÉTODOS	91
2.1.1	Determinação de concentração com o hemocitômetro de Neubauer ..	91

2.1.2	Determinação de concentração com a câmara de Makler.....	93
2.1.3	Determinação de concentração com esferas de látex.....	94
2.2	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	96
3	RESULTADOS	97
3.1	GARANTIA DA QUALIDADE PARA MEDIDA DE CONCENTRAÇÃO UTILIZANDO ESFÉRAS DE LÁTEX.....	97
3.2	COMPARAÇÃO ENTRE O HEMOCITÔMETRO DE NEUBAUER E A CÂMARA DE MAKLER PARA DETERMINAÇÃO DE CONCENTRAÇÃO DE ESPERMATOZOIDES	102
4	DISCUSSÃO.....	106
5	CONCLUSÃO	113
	CONCLUSÕES GERAIS	114
	REFERÊNCIAS.....	115
	ANEXO A – CARTAZ DE DIVULGAÇÃO DO PROJETO	131
	ANEXO B – QUESTIONÁRIO DE DADOS DEMOGRÁFICOS E HÁBITOS DE VIDA	132
	ANEXO C – ESCALA DE ESTRESSE PERCEBIDO	135
	ANEXO D – INVENTÁRIO DE EVENTOS DE VIDA ESTRESSANTES.....	136
	ANEXO E – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA.....	137
	ANEXO F – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)...	141

1 INTRODUÇÃO GERAL

Infertilidade é a incapacidade de um casal engravidar após um ano de relações sexuais regulares desprotegidas (ZEGERS-HOCHSCHILD et al., 2017). Dados demográficos indicam que a infertilidade é um problema reprodutivo global enfrentado por 8 a 12% dos casais (BORGHT; WYNS, 2018). A infertilidade pode ocorrer devido a fatores masculinos, fatores femininos ou uma combinação dos dois fatores. De forma geral, cerca de 30% dos casos de infertilidade são em virtude somente de fatores masculinos. Fatores femininos contribuem de forma isolada com cerca de 30% dos casos de infertilidade, enquanto 20-30% dos casos restantes são em virtude de uma combinação de fatores masculinos, femininos ou idiopáticos (AGARWAL et al., 2015; PATEL; LEONG; RAMASAMY, 2017; QUAAS; DOKRAS, 2008).

Fatores relacionados aos hábitos de vida como o consumo de álcool, uso de tabaco e estresse psicológico foram previamente associados com a redução da qualidade dos parâmetros seminais ao longo dos anos, porém, demais estudos são necessários, pois essas associações se apresentam de forma conflitante dependendo da região geográfica e da população estudada (BHADORIA et al., 2020; KESKIN et al., 2016; KOVAC; KHANNA; LIPSHULTZ, 2015; NORDKAP et al., 2020; RICCI et al., 2017). Recentemente, foi observado que a infecção por COVID-19 também parece afetar os parâmetros espermáticos (HOLTMANN et al., 2020).

Estudos de infertilidade masculina vem ganhando destaque nos últimos anos, pois existe uma preocupação crescente de que a qualidade do sêmen humano está em declínio. Entre 1973 e 2018 houve um declínio de 53% nas contagens de espermatozoides de homens da população geral (LEVINE et al., 2022). É necessário, no entanto, que os métodos utilizados para determinar a concentração espermática sejam precisos e acurados. As condições de armazenamento da amostra também parecem influenciar os parâmetros espermáticos de motilidade e vitalidade (APPELL; EVANS, 1977; SCHULTE et al., 2008), porém não é claro qual a influência sobre a concentração. Além disso, o papel do dano à cromatina espermática sobre demais parâmetros do espermograma após diferentes condições de armazenamento da amostra também não foi elucidado.

Dessa forma, esse estudo visou avaliar a relação entre hábitos de vida e qualidade do sêmen, estudar a influência das condições de armazenamento sobre

os parâmetros espermáticos e avaliar a precisão e a acurácia do hemocitômetro de Neubauer e da câmara de Makler como métodos de determinação da concentração de espermatozoides.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 ESPERMATOGÊNESE

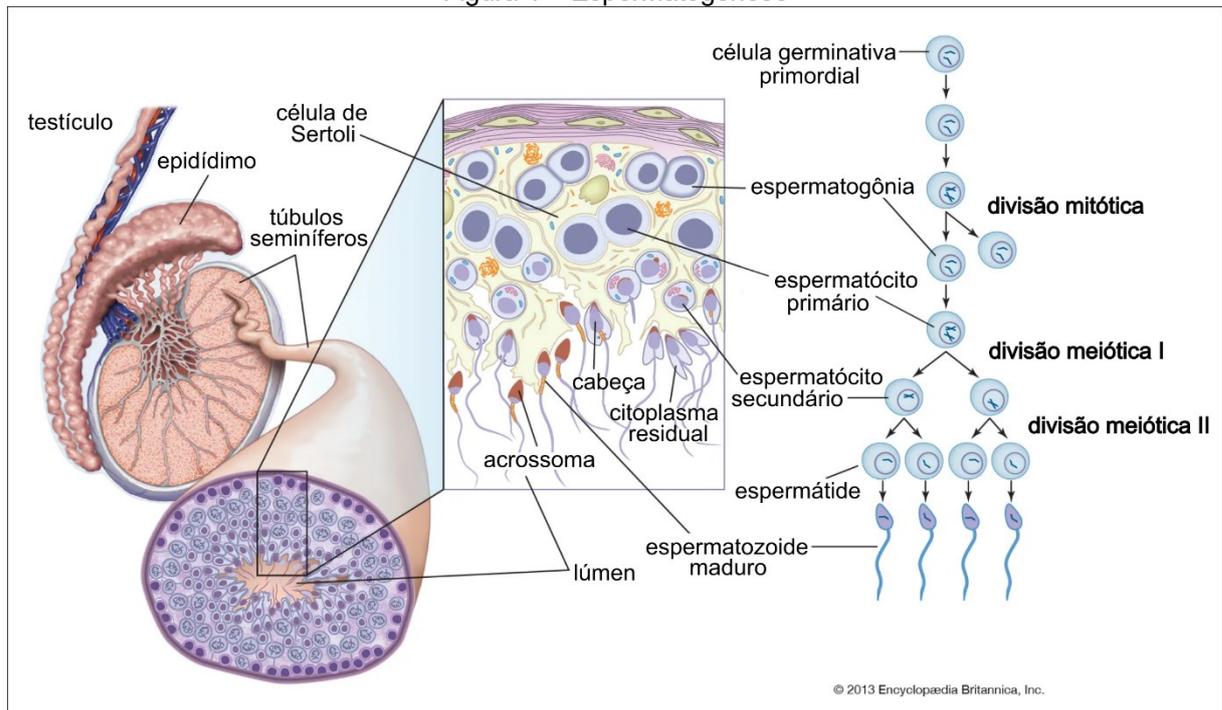
A espermatogênese inclui todos os eventos de diferenciação desde a célula germinativa imatura até a formação do espermatozoide, o gameta masculino. Esse processo acontece no interior dos testículos em estruturas chamadas túbulos seminíferos. Durante a formação do embrião, as células germinativas primordiais migram para os testículos para se tornarem células germinativas imaturas chamadas espermatogônias. A espermatogênese (Figura 1) é dividida em três fases. Na primeira fase, as espermatogônias passam por uma série de ciclos de replicação de DNA e mitoses até se diferenciarem em espermátócitos. Na segunda fase, o genoma diploide dos espermátócitos primários é reduzido em espermátócitos secundários haploides por meios de divisões meióticas até a maturação em espermátides. Finalmente, na terceira fase, as espermátides se diferenciam em espermatozoides (SADLER, 2018).

A espermatogênese acontece como resultado da estimulação de hormônios gonadotrópicos do eixo hipotálamo-hipófise-gonadal (HHG), tendo início em torno dos 13 anos de idade e ocorrendo durante a maior parte da vida, mas diminuindo na velhice. A maturação das células germinativas e a regulação hormonal do eixo HHG dependem majoritariamente de duas células localizadas nos túbulos seminíferos: a célula de Sertoli e a célula de Leydig (GUYTON; HALL, 2011).

As células de Sertoli são indispensáveis no processo de espermatogênese e ocupam de 17 a 20% do epitélio dos túbulos seminíferos em homens adultos. A morfologia das células de Sertoli está em constante mudança, com vastas ramificações citoplasmáticas que envolvem as células germinativas e auxiliam na sua migração em direção ao lúmen dos túbulos seminíferos durante a espermatogênese. O regulador mais importante das células de Sertoli é o hormônio folículo estimulante (FSH), que é produzido pela hipófise sob o estímulo do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH). O FSH ativa diversas vias, estimulando praticamente todas as funções relacionadas à espermatogênese. Já as células de Leydig estão localizadas em aglomerados geralmente encontrados em posições estratégicas entre os vasos sanguíneos e o túbulo seminífero. A testosterona é o principal produto das células de Leydig e os testículos secretam entre 3 e 10 mg/dia

de testosterona, contabilizando mais de 95% do total de testosterona circulante em homens pós-púberes. O hormônio luteinizante (LH) atua ligando-se a receptores de LH de alta afinidade na membrana plasmática de células de Leydig, estimulando a produção de testosterona e estradiol dentro de 24-72 horas. Além do feedback negativo hipotalâmico/hipofisário, a testosterona também regula a função das células de Leydig por meio de um feedback negativo ultracurto (NETO et al., 2016).

Figura 1 – Espermatogênese



Fonte: Adaptado de Encyclopedia Britannica (2013).

As espermatogônias são o ponto chave da linhagem germinativa da espécie, uma vez que as células precisam se expandir mitoticamente antes da meiose. Um número muito grande de espermatozoides deve ser produzido para manter a fertilidade, portanto, as espermatogônias devem manter a integridade do DNA contra o acúmulo de erros de replicação e exposição a mutagênicos ambientais (SCHLATT; EHMCKE, 2014).

As três principais teorias que foram propostas para identificar a origem do dano ao DNA espermático são espécies reativas de oxigênio (EROs), empacotamento anormal da cromatina espermática e apoptose. As fontes de EROs no sêmen são associadas a exposição à radiação, tabagismo, herbicidas e abuso de álcool. A presença de alta concentração de EROs resulta em perda de motilidade

espermática, potencial de fertilização e danos ao DNA (AGARWAL et al., 2014). O empacotamento da cromatina é um processo crítico necessário para acomodar a enorme quantidade de DNA em uma pequena célula de espermatozoide. Nos gametas masculinos, as histonas são fisiologicamente substituídas por protaminas ricas em arginina, que tem maior capacidade em compactar o material genético. Há evidências de que o dano ao DNA pode derivar de empacotamento anormal da cromatina devido à insuficiência de protaminas, que induz quebras na cadeia de DNA (MILLER; BRINKWORTH; ILES, 2010). A apoptose é uma forma de morte celular programada e é importante para o desenvolvimento da espermatogênese. Durante a espermatogênese, a apoptose limita o tamanho da população de células germinativas e ajuda a manter a proporção ideal de células germinativas/células de Sertoli. No entanto, as células destinadas a serem eliminadas podem escapar do processo de apoptose e chegar ao ejaculado. A presença de espermatozoides no ejaculado que possuem marcadores apoptóticos exibindo formas morfológicas anormais ou função bioquímica irregular pode contribuir com DNA danificado para as gerações subseqüentes com o aumento do uso de procedimentos de reprodução assistida (GUNES; AL-SADAAN; AGARWAL, 2015).

2.2 INFERTILIDADE

2.2.1 Aspectos epidemiológicos

A infertilidade é definida como a ausência de gravidez após um ano de relações sexuais regulares e desprotegidas (ZEGERS-HOCHSCHILD et al., 2017). É uma condição clínica que afeta cerca de 45,8 milhões de casais no mundo e que vem ganhando destaque devido a redução das taxas de fertilidade em muitos países desenvolvidos e ao número crescente de procedimentos de fertilização *in vitro* (FIV) (BORGHT; WYNS, 2018; SCHMIDT et al., 2012).

Fatores socioeconômicos como o aumento da participação da mulher no mercado de trabalho, equidade de gênero, condições de moradia e incerteza econômica resultaram no adiamento de filhos ainda não desejados durante o planejamento familiar desde a introdução de métodos contraceptivos confiáveis na década de 1960 (GOLDIN, 2006; MILLS et al., 2011). No entanto, existe uma relação direta entre o avanço da idade dos pais e o declínio progressivo da

fertilidade. Estima-se que para ter uma chance de pelo menos 90% de ter um filho, a mulher deve começar as tentativas naturais de engravidar com no máximo 32 anos. Se o casal deseja ter mais filhos, a idade máxima para iniciar as tentativas é ainda menor (27 anos para dois filhos e 23 anos para três filhos). Quando FIV é uma opção, a idade máxima ideal para ter um filho é de 35 anos (HABBEMA et al., 2015). Em homens, embora os espermatozoides sejam produzidos de forma contínua, evidências indicam que a idade paterna avançada está associada a um impacto negativo no número de células de Sertoli, nas células de Leydig e na quantidade de células germinativas nos testículos (LAWSON; FLETCHER, 2014; MAHMOUD et al., 2003; NEAVES et al., 1984). Foi verificado que a quantidade de danos ao DNA nos espermatozoides de homens com idade entre 36 e 57 anos é três vezes maior do que em homens com menos de 35 anos (SINGH; MULLER; BERGER, 2003). Acredita-se que danos ao DNA e mutações que ocorrem durante a maturação das células germinativas masculinas desempenham um papel importante na deficiência da fertilização, no desenvolvimento embrionário, na perda da gravidez e no aumento do risco de certas doenças decorrentes da idade paterna avançada, como fenda palatina e leucemia linfoblástica aguda na infância (AITKEN et al., 2010; BILLE et al., 2005; MURRAY et al., 2002).

As taxas de fecundidade totais (TFT) em muitos países de renda alta estão abaixo dos 2,1 nascimentos por mulher, necessários para a reposição da população e uma das razões é justamente o aumento da idade dos pais ao primeiro nascimento (SCHMIDT et al., 2012). As TFT globais sofreram um declínio de 49,4% entre 1950 e 2017, com redução de 4,7 para 2,4 nascimentos por mulher. A variação de TFT foi de 1 nascimento por mulher em Chipre (0,9 - 1,2) a 7,1 nascimentos por mulher no Níger (6,8 - 7,4). Além disso, 33 países tiveram uma taxa de crescimento populacional negativa entre 2010 e 2017, a maioria dos quais estavam localizados na Europa central, oriental e ocidental. Por outro lado, a população global tem aumentado em uma média de 83,8 milhões de pessoas por ano desde 1985. Portanto, embora as TFT estejam diminuindo, a população global continua a crescer à medida que a mortalidade diminui, com diferentes padrões entre países e faixas etárias (GBD 2017 POPULATION AND FERTILITY COLLABORATORS, 2018).

No Brasil, a TFT observada foi de 1,77 com base nos dados da Pesquisa Nacional de Demografia e Saúde (PNDS) de 2006. Nesses dados, foi verificado que a paridade aumenta com a idade. Mulheres entre 15 e 19 anos tiveram uma média

de 0,18 filhos por mulher, enquanto mulheres no final do período reprodutivo (entre 45 e 49 anos) tiveram uma paridade média de 3,14 filhos. Além da idade, características positivamente associadas ao aumento do número de nascimentos foram: residir no norte do país, residir em zona rural, ser não-branco, emprego não remunerado, menor escolaridade e menor nível socioeconômico (TEJADA et al., 2017). Segundo projeções de população do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), a TFT deve reduzir de 1,75 em 2023 para 1,66 em 2060, já a taxa de mortalidade deve superar pela primeira vez a taxa de natalidade no Brasil em 2047 (IBGE, 2023).

A decisão dos casais de adiarem a gravidez devido a fatores pessoais e socioeconômicos com consequente declínio da fertilidade é um dos principais fatores que explicam o aumento da procura por procedimentos de reprodução assistida (MILLS et al., 2011). Desde o nascimento do primeiro bebê por FIV em 1978, mais de 6 milhões de nascimentos por esse procedimento foram contabilizados em todo o mundo (LEDFORD, 2018). Segundo o 13º Relatório do Sistema Nacional de Produção de Embriões (ANVISA, 2022), o número de ciclos de FIV realizados no Brasil teve crescimento de 212,1% entre os anos de 2012 e 2019. Somente em 2019 foram realizados 44.705 ciclos. Atualmente, o Brasil conta com 183 centros de reprodução humana assistida. No mapa da figura 2, o tamanho das bolhas azuis reflete proporcionalmente a diferença do número de centros de reprodução humana assistida nas unidades federativas em que estão presentes (23). São Paulo é o estado com o maior número no Brasil com 63 centros, já Santa Catarina conta com 8 centros.

O sucesso do tratamento de infertilidade por procedimentos de reprodução assistida depende fortemente de fatores econômicos, pois casais de renda mais alta e com ensino superior tem probabilidade maior de fazer mais ciclos de tratamento de fertilidade de alta intensidade e consequentemente de engravidar (SMITH et al., 2011).

Nos Estados Unidos, verificou-se que os custos médios com tratamentos de fertilidade em um período de 18 meses variaram de \$24.373 para FIV a \$38.015 para FIV com doação de óvulos (KATZ et al., 2011). No Brasil, gasta-se em média R\$15.000 a R\$20.000 com procedimentos de FIV. No entanto, a escolha da clínica de reprodução assistida, a idade do casal, testes complementares solicitados e a quantidade de medicamentos sugeridos podem elevar o preço do tratamento a

valores superiores a R\$70.000 (BOYADJIAN, 2019). De acordo com a PORTARIA Nº 3.149, DE 28 DE DEZEMBRO DE 2012, recursos financeiros devem ser destinados aos estabelecimentos de saúde que realizam procedimentos de atenção à Reprodução Humana Assistida no âmbito do Sistema Único de Saúde (SUS), incluindo FIV e/ou injeção intracitoplasmática de espermatozoides. De acordo com o Cadastro Nacional de Estabelecimento de Saúde (CNES), 14 clínicas realizam procedimentos de reprodução assistida no Brasil com atendimento pelo SUS (CNES, 2023).

Figura 2 – Número de centros de reprodução humana assistida no Brasil por unidade federativa



Fonte: 13º Relatório do Sistema Nacional de Produção de Embriões (ANVISA, 2022).

O adiamento das tentativas de alcançar a paternidade para uma idade mais avançada pode ter um impacto negativo mais profundo ainda em casais que não terão acesso a tratamentos bem-sucedidos de FIV por questões financeiras. Além dessa tendência social de ter filhos mais tarde na vida, outro fator vem desempenhando um papel importante no aumento da infertilidade conjugal: a redução da qualidade do sêmen (SHARPE, 2012).

2.2.2 Aspectos etiológicos da infertilidade masculina

Na década de 1990, um estudo concluiu que entre 1938 e 1991 a concentração de espermatozoides havia diminuído consideravelmente, porém os autores não puderam concluir se essa redução continuaria pelos próximos anos (CARLSEN et al., 1992). Outro estudo confirmou os dados relatados por Carlsen e colaboradores (1992), no entanto estudos em países não ocidentais foram limitados e não mostraram a mesma tendência de declínio na concentração de espermatozoides (SWAN; ELKIN; FENSTER, 2000). Devido a controvérsia no assunto, uma nova metanálise foi publicada (LEVINE et al., 2017). Esse estudo concluiu que entre 1973 e 2011 houve um declínio de 50-60% nas contagens de espermatozoides de homens da América do Norte, Europa, Austrália e Nova Zelândia. Os autores do estudo não puderam concluir se nos demais países essa mesma tendência de queda existe, pois o poder estatístico da metanálise foi limitado devido ao pequeno número de estudos (LEVINE et al., 2017). Recentemente, uma nova metanálise incluindo países da Ásia, África e América do Sul/Central confirmou declínio de 31% nas concentrações de espermatozoides nessas regiões (LEVINE et al., 2022).

O declínio na qualidade do sêmen desses indivíduos pode estar associado a diversos fatores ambientais. Um deles é a exposição a produtos químicos desreguladores endócrinos mesmo antes do nascimento. A alteração da função de hormônios que regulam o desenvolvimento do trato reprodutivo masculino pode levar a criptorquidia (os testículos não descem para a bolsa escrotal) e hipospádia (malformação congênita da genitália masculina), com conseqüente redução na qualidade dos parâmetros seminais (GORE et al., 2015). Pesticidas podem interferir com o eixo hipotálamo-hipófise-gonadal que regula a função das células de Sertoli e de Leydig por meio da produção das gonadotrofinas, FSH e LH, prejudicando, dessa forma, a espermatogênese e esteroidogênese (MEHRPOUR et al., 2014; SENGUPTA; BANERJEE, 2014). Outro fator que está associado à redução da qualidade do sêmen é a varicocele. A varicocele aumenta a temperatura escrotal e reduz a perfusão testicular. Estima-se que 35% dos homens com infertilidade primária (que nunca tiveram filhos) e 80% dos homens com infertilidade secundária (que já tiveram uma gravidez anterior) tenham varicocele (BAAZEEM et al., 2011; GORELICK; GOLDSTEIN, 1993).

A exposição ao calor excessivo demonstrou ser prejudicial para a saúde dos espermatozoides (ZHOU et al., 2020). Alguns aspectos do uso de celulares parecem estarem envolvidos com a redução da qualidade do sêmen. Usar o celular por mais de uma hora ou enquanto ele está sendo carregado foram associados a concentrações anormais de espermatozoides (ZILBERLICHT et al., 2015). O consumo excessivo de gorduras saturadas na dieta foi associado com concentração e motilidade reduzida (AFEICHE et al., 2013; JENSEN et al., 2013). Além disso, em homens com um índice de massa corpórea aumentada, a motilidade dos espermatozoides também se mostrou prejudicada (TANG et al., 2015). Consumo de álcool e tabaco também demonstraram estarem associados com parâmetros do sêmen alterados (HARLEV et al., 2015; LA VIGNERA et al., 2013). Esses fatores contribuem com a formação intracelular de espécies reativas de oxigênio no sêmen (HOMA et al., 2015; MAYORGA-TORRES et al., 2017) e com dano ao DNA espermático (PANNER SELVAM et al., 2020) reduzindo, dessa forma, as chances de estabelecer uma gravidez (FIRNS et al., 2015). Por outro lado, estudos em populações diferentes mostram associações conflitantes entre esses fatores e parâmetros seminais (KESKIN et al., 2016; MACDONALD et al., 2010; RICCI et al., 2017).

2.2.2.1 *Estresse psicológico*

O estresse psicológico é um fator notável que também vem sendo associado a alterações nos parâmetros seminais (BHONGADE et al., 2015; CLARKE et al., 1999; JANEVIC et al., 2014; LI et al., 2013; NORDKAP et al., 2016). No entanto, essa associação não é unânime, com alguns trabalhos demonstrando que o estresse não foi um forte determinante na qualidade do sêmen e dos hormônios sexuais (COWARD et al., 2019; HJOLLUND et al., 2004).

Uma das principais explicações biológicas apontadas para o estresse psicológico levar a redução da qualidade do sêmen refere-se às variações da secreção de hormônios do eixo hipotálamo-hipófise-gonadal em resposta ao estresse, o que altera a função das células de Sertoli e da barreira hemato-testicular (BHONGADE et al., 2015; NARGUND, 2015). Por outro lado, o estresse psicológico como fator primário e independente na infertilidade masculina é difícil de ser isolado, pois fatores confundidores como obesidade, consumo de álcool e uso de tabaco

estão comumente associados a indivíduos deprimidos e ansiosos (AL-ASADI; KLEIN; MEYER, 2015; REGIER et al., 1990) e esses fatores também já foram associados a diminuição da qualidade dos parâmetros seminais (BENATTA et al., 2020; KOVAC; KHANNA; LIPSHULTZ, 2015; RICCI et al., 2017). Dessa forma, é imprescindível que fatores confundidores sejam identificados.

Com base na literatura sobre diferenças de gênero, uma hipótese postula que a ligação entre a capacidade de procriar e a virilidade pode influenciar as reações dos homens à infertilidade a medida em que homens podem perceber a incapacidade de gerar um filho como uma ameaça à sua autoimagem de masculinidade (CULLEY; HUDSON; LOHAN, 2013). Além disso, homens são menos propensos do que mulheres a buscar ajuda psicológica por causa da percepção do papel tradicional do gênero masculino, que inclui independência, autocontrole e autossuficiência (PEDERSON; VOGEL, 2007). Foi verificado que homens submetidos a tratamento de infertilidade experimentam níveis de angústia semelhantes aos das mulheres (PERONACE; BOIVIN; SCHMIDT, 2007). Homens participando de grupos de apoio online foram capazes de discutir abertamente sobre uma série de sentimentos e preocupações com relação à experiência de infertilidade. Ao invés de simplesmente ficarem "desapontados" com sua incapacidade de se tornarem pais, esses homens claramente estavam experimentando uma série de emoções negativas e dificuldades. Grupos online de apoio podem fornecer um local e contexto úteis para os homens se abrirem sobre seus problemas de fertilidade, sem as inibições associadas às discussões face a face (MALIK; COULSON, 2008; RICHARD; BADILLO-AMBERG; ZELKOWITZ, 2017).

Existem muitas escalas disponíveis para avaliar o estresse psicológico, porém não se sabe qual é a mais sensível para descrever o estresse que é pertinente para capturar os potenciais efeitos biológicos negativos da função testicular. A escolha da medida deve ser baseada no objetivo da avaliação, mas isso pode dificultar comparações diretas entre os estudos (BRÄUNER et al., 2020).

A Escala do Estresse Percebido mede o grau em que as situações na vida de uma pessoa são avaliadas como estressantes (COHEN; KAMARCK; MERMELSTEIN, 1983).

Um estudo comparou escalas de estresse com a função testicular (NORDKAP et al., 2020). Nesse estudo, a escala de Eventos de Vida proposta por

Holmes e Rahe incluiu os eventos mais estressantes que acometeram o participante no último ano. O estresse percebido foi avaliado com o questionário de 10 itens da Escala de Cohen de Estresse Percebido. Homens com pontuações altas na escala de estresse percebido tiveram menor concentração de espermatozoides, contagem total de espermatozoides e motilidade, já eventos de vida estressantes não foram associados à função testicular. A associação linear entre o estresse percebido e os parâmetros do sêmen indicaram que o estresse percebido foi o marcador mais sensível de estresse afetando a qualidade do sêmen em homens jovens (NORDKAP et al., 2020). Da mesma forma, outro estudo verificou uma associação inversa entre o escore de estresse percebido e a concentração de espermatozoides, motilidade e morfologia. Estresse percebido e eventos de vida estressantes, mas não estresse relacionado ao trabalho, foram associados à qualidade do sêmen (JANEVIC et al., 2014). Por outro lado, um estudo que aplicou a escala de Cohen em homens atendendo uma clínica de infertilidade não verificou associação entre o estresse percebido e a qualidade do sêmen (JUREWICZ et al., 2014).

2.2.2.2 COVID-19

Os coronavírus são vírus de ácido ribonucleico (RNA) de fita simples pertencentes a família *Coronaviridae* que causam infecção respiratória em mamíferos, como morcegos, camelos, ratos, gatos, cachorros e humanos. Até o momento, houve três grandes surtos de coronavírus relatados em humanos, sendo o mais recente a disseminação do coronavírus da síndrome respiratória aguda grave 2 (SARS-CoV-2) que é conhecido por causar a doença do coronavírus de 2019 (COVID-19) (SHARMA; AHMAD FAROUK; LAL, 2021).

A proteína da espícula do coronavírus, uma proteína de superfície viral, desempenha um papel chave na ligação viral e entrada na célula hospedeira. O SARS-CoV-2 utiliza uma proteína da espícula do vírus para se ligar ao receptor da enzima conversora de angiotensina 2 (ECA2) do hospedeiro, encontrado não somente em células pulmonares, mas também em células nos rins, sistema cardiovascular, gastrointestinal e testículos. A ECA2 é expressa por células de Leydig, células de Sertoli e células da linhagem germinativa nos testículos (FU et al., 2020; LIU et al., 2020). Infecção grave por COVID-19 parece prejudicar os parâmetros espermáticos (HOLTMANN et al., 2020), porém, os mecanismos que

podem levar a infertilidade masculina ainda não estão totalmente elucidados. Os mecanismos mais importantes são classificados como patogênese direta e indireta do SARS-CoV-2. A via direta é causada pela entrada do vírus devido a presença de ECA2 na superfície de células testiculares, levando a inflamação testicular (orquite). Na via indireta, o aumento dos níveis de citocina, desregulação do eixo renina-angiotensina-aldosterona, hipóxia, febre, alterações cerebrais e terapia com antivirais possivelmente poderiam levar à desregulação da testosterona, a vários prejuízos fisiológicos e à produção prejudicada de espermatozoides (ZADEH; ARAB, 2021).

2.2.3 Abordagem diagnóstica de infertilidade masculina

O espermograma deve ser o primeiro exame realizado quando se suspeita de infertilidade masculina. Homens apresentam medidas dos parâmetros seminais abaixo do ideal em quase metade de todos os casais que apresentam infertilidade (AGARWAL et al., 2015).

O espermograma deve ser realizado após um período de abstinência de 2 a 7 dias e essa análise do sêmen deve ser feita imediatamente após a ejaculação. A OMS possui um manual para o exame laboratorial e processamento do sêmen humano que atualmente está em sua sexta edição (WHO, 2021). Os resultados foram obtidos a partir da análise de dados publicados após a quinta edição do manual. No total, foram analisados mais de 3500 indivíduos de doze países e cinco continentes que haviam se tornado pais de forma natural nos último doze meses. Os valores do 5º percentil para os parâmetros de volume, concentração, contagem total, motilidade total, motilidade progressiva, motilidade não progressiva, espermatozoides imóveis, vitalidade e formas normais foram determinados junto com os intervalos de confiança (IC) de 95% para estabelecer valores de referência inferiores mais abrangentes e globalmente aplicáveis para os parâmetros seminais de homens férteis (CAMPBELL et al., 2021) (Quadro 1).

A primeira edição do manual da OMS para processamento de sêmen foi publicada em 1980. Apesar das primeiras edições terem servido para padronizar a forma como o espermograma é feito em todo o mundo, alguns dos valores de referência precisaram ser revisados devido as tendências de mudanças mundiais nos parâmetros do sêmen. Em relação a versões anteriores, o limite inferior de

volume de sêmen foi reduzido de 2,0 ml para 1,4 ml. O número total de espermatozoides foi reduzido de 40×10^6 para 39×10^6 por ejaculado. A concentração de espermatozoides foi reduzida de $20 \times 10^6/\text{ml}$ para $16 \times 10^6/\text{ml}$. A motilidade total passou de 50% para 42%. A vitalidade passou de mais de 75% para 54% e a morfologia normal teve limite reduzido de um valor 30% para 4%. Esse último item teve uma redução drástica porque na terceira edição do manual foi utilizada a morfologia proposta pela OMS, já na quinta edição a morfologia estrita estabelecida por Kruger foi implementada, que é muito mais criteriosa (BELSEY, 1980; WHO, 1993, 2021).

A quinta edição do manual foi criticada por sugerir limites de referência dos parâmetros seminais como peça central na avaliação do potencial de fertilidade masculina. As preocupações com os limites de referência da edição de 2010 giravam em torno de sua possível inadequação para representar a população em geral, pois a população estudada para a criação dos limites de referência era restrita a um grupo de indivíduos pertencentes a América do Norte, Europa e Austrália. Homens de outras regiões não foram contemplados no estudo. Esse fato impediu o exame de discrepâncias regionais que poderiam explicar a variabilidade da qualidade do sêmen em diferentes locais. Outros vieses potenciais incluíram variações biológicas intra e interindividuais e variações técnicas entre os laboratórios, com alguns sem garantia e controle formal da qualidade (ESTEVEZ, 2014).

Quadro 1 – Distribuição de resultados de exame de sêmen de homens em casais que iniciaram uma gravidez natural dentro de um ano após início de relação sexual desprotegida

Parâmetro seminal	n	Percentil									
		2,5	5,0	(IC 95%)	10	25	50	75	90	95	97,5
Volume (ml)	3586	1,0	1,4	(1,3 – 1,5)	1,8	2,3	3,0	4,2	5,5	6,2	6,9
Concentração (10 ⁶ /ml)	3587	11	16	(15 – 18)	22	36	66	110	166	208	254
Contagem total (10 ⁶ por ejaculado)	3584	29	39	(35-40)	58	108	210	363	561	701	865
Motilidade total (a+b+c, %)	3488	35	42	(40 – 43)	47	55	64	73	83	90	92
Motilidade progressiva (a+b, %)	3389	24	30	(29 – 31)	36	45	55	63	71	77	81
Motilidade não progressiva (c, %)	3387	1	1	(1 – 1)	2	4	8	15	26	32	38
Espermatozoides imóveis (d, %)	2800	15	20	(19 – 20)	23	30	37	45	53	58	65
Vitalidade (%)	1337	45	54	(50 – 56)	60	69	78	88	95	97	98
Formas normais (%)	3335	3	4	(3,9 – 4,0)	5	8	14	23	32	39	45

Fonte: Adaptado de Campbell et al. (2021).

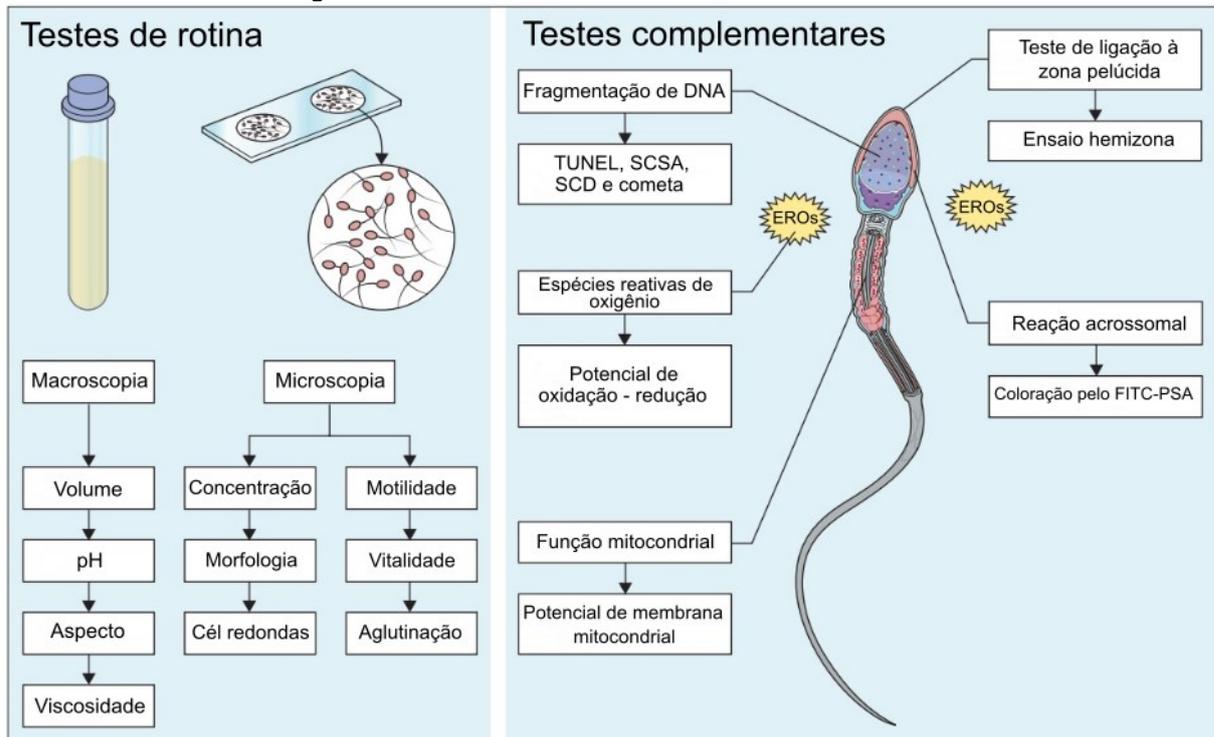
Legenda: Os dados obtidos pelo estudo de Campbell et al. (2021) foram utilizados para estabelecer os limites de referência inferiores para os parâmetros seminais da 6ª edição do manual da Organização Mundial da Saúde para o exame e processamento do sêmen humano. Foram analisados dados de mais de 3500 indivíduos de doze países e cinco continentes. Quinto percentil dado com variabilidade (intervalo de confiança (IC) de 95%).

A sexta edição tornou a análise dos parâmetros básicos do sêmen mais robusta, levando em consideração as críticas das edições anteriores e incluindo detalhes de testes complementares, como para a análise de fragmentação do DNA espermático e do estresse oxidativo seminal. Além dessas diferenças, a última edição sugere a substituição de limites de referência por limites de decisão, uma vez que os limites de referência não representam limites distintos entre homens férteis e inférteis e as decisões devem ser tomadas com base em considerações clínicas e estatísticas que apontam para a necessidade de uma determinada intervenção diagnóstica ou terapêutica. Por outro lado, a retirada dos limites de referência também gerou críticas, uma vez que não foi proposto na sexta edição limites de decisão para os parâmetros básicos do sêmen ou para os testes complementares, com menção de que cada laboratório deve estabelecer seus próprios intervalos de referência. Além disso, apesar da maior contemplação de regiões geográficas na sexta edição, com inclusão de países da Europa ocidental, Ásia e África, algumas regiões continuaram sub representadas, como a América do Sul e a África Subsaariana (BOITRELLE et al., 2021).

As causas mais comuns encontradas durante a investigação de infertilidade masculina são fatores hormonais, testiculares ou obstrutivos. Portanto, o primeiro passo após um resultado alterado de espermograma é a realização testes hormonais de quantificação de LH, FSH e testosterona. Se nenhum espermatozoide for encontrado na análise de sêmen, testículos pequenos sugerem uma causa hormonal ou testicular, enquanto testículos de tamanho normal apontam para um problema obstrutivo (WALL; JAYASENA, 2018).

Em casos de redução na qualidade do sêmen observados no espermograma, pacientes podem ser capazes de conceber naturalmente sem tratamento, mas o prognóstico depende de quão severamente a função espermática está prejudicada e da idade do casal. Em cerca de um terço dos pacientes, nenhuma causa de infertilidade é identificada (WALL; JAYASENA, 2018). A avaliação de demais parâmetros como a análise de estresse oxidativo, fragmentação de DNA, potencial de membrana mitocondrial, teste de ligação à zona pelúcida e reação acrossômica podem ajudar a elucidar problemas não identificados no espermograma que podem ser potenciais causas da infertilidade masculina (AGARWAL et al., 2021) (Figura 3).

Figura 3 – Testes laboratoriais em amostras de sêmen



Fonte: Adaptado de Agarwal et al. (2021).

Legenda: EROS = espécies reativas de oxigênio; FITC-PSA = aglutinina *Pisum sativum* marcada com isotiocianato de fluoresceína; SCD = teste de dispersão da cromatina espermática; SCSA = ensaio de estrutura de cromatina espermática; TUNEL = de marcação de "nicks" por dUTP-biotina mediada por desoxinucleotidil transferase terminal.

Espécies reativas de oxigênio desempenham um papel importante na maturação e capacidade de fertilização dos espermatozoides. Junto ao influxo de cálcio, as EROs propiciam o processo de capacitação, no qual a membrana plasmática dos espermatozoides aumenta a fluidez e ganha a capacidade de se fundir com o oócito (DE LAMIRANDE; GAGNON, 1993). Por outro lado, a grande quantidade de ácidos graxos poliinsaturados, responsáveis pela fluidez na membrana plasmática dos espermatozoides, torna-os suscetíveis a danos oxidativos. Dessa forma, o estresse oxidativo ocorre quando a concentração de EROs excede a concentração de antioxidantes no sêmen. O estresse oxidativo induz a capacitação prematura e afeta a integridade da membrana plasmática dos espermatozoides, tornando-os menos adequados para a fertilização (AGARWAL et al., 2018; AITKEN, 2017; SAID; RANGA; AGARWAL, 2005). A detecção de espécies reativas de oxigênio pode ser obtida por ensaios diretos ou indiretos. Os ensaios diretos medem o desequilíbrio oxidativo líquido entre a produção de EROs e a concentração de antioxidantes no sêmen. Ensaios indiretos avaliam os efeitos do

estresse oxidativo, como nível de peroxidação lipídica ou danos ao DNA espermático (KO; SABANEH; AGARWAL, 2014).

Os testes comumente utilizados em laboratórios de andrologia para determinar fragmentação de DNA são: o método de marcação de "nicks" por dUTP-biotina mediada por desoxinucleotidil transferase terminal (TUNEL, do inglês *deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labeling assay*) em que as quebras do DNA são detectadas pela incorporação de nucleotídeos fluorescentes nos sítios fragmentados; o teste de cometa, que é baseado da descompactação nuclear seguida de eletroforese para medir quebras de fita do DNA em espermatozoides individuais; o teste de estrutura da cromatina espermática, (SCSA, do inglês *sperm chromatin structure assay*) e o teste de dispersão da cromatina espermática (SCD, do inglês *sperm chromatin dispersion*), que baseiam sua detecção de fragmentação de DNA na capacidade de desnaturação da cromatina do espermatozoide (RIBAS-MAYNOU et al., 2013).

Quando o potencial de membrana mitocondrial espermática aumenta, os parâmetros de motilidade espermática e o potencial de fertilidade também aumentam. O uso de sondas fluorescentes para detectar mudanças no potencial de membrana mitocondrial é a ferramenta mais popular usada para avaliar a função mitocondrial. Altas concentrações de fluorocromos se acumulam em mitocôndrias hiperpolarizadas (alto potencial de membrana mitocondrial), enquanto concentrações mais baixas são encontradas em mitocôndrias despolarizadas (baixo potencial de membrana mitocondrial) (BARBAGALLO et al., 2020).

O ensaio de hemizona foi desenvolvido como um teste de diagnóstico para testar a ligação de espermatozoides humanos à zona pelúcida para prever o potencial de fertilização. Para o teste, um óvulo humano não utilizável é cortado pela metade. Enquanto um lado é exposto a uma amostra controle de espermatozoides férteis, a outra metade é exposta a amostra de teste. A ligação máxima do espermatozoide à zona pelúcida geralmente ocorre após 4 a 5 horas de incubação. Espermatozoides de homens férteis exibem uma capacidade de ligação maior à hemizona em comparação com homens que tiveram falha na fertilização durante tratamento por FIV (BURKMAN et al., 1988; OEHNINGER; MORSHEDI; FRANKEN, 2013).

A reação acrossômica do espermatozoide humano é aplicado para testar a capacidade do espermatozoide em penetrar a zona pelúcida e sua fusão com a

membrana plasmática. O teste de aglutinina *Pisum sativum* marcada com isotiocianato de fluoresceína (FITC-PSA) é usado para a avaliação acrossomal. Os espermatozoides com cromossoma íntegro não se coram, pois o corante não consegue penetrar na membrana acrossomal íntegra, enquanto em acrossomas danificados o corante FITC-PSA entra em contato com o conteúdo acrossomal, corando essa região em verde amarelado fluorescente (FARLIN et al., 1992).

3 JUSTIFICATIVA

Apesar de diversos avanços feitos na medicina reprodutiva humana, problemas de fertilidade vêm se tornando cada vez mais frequentes entre casais no mundo (BORGHT; WYNS, 2018). Parte desses problemas de fertilidade pode ser atribuído a redução da qualidade do sêmen ao longo dos anos. (AUGER et al., 1995; FEKI et al., 2009; SENGUPTA et al., 2018). Foi observado que parâmetros seminais apresentam médias distintas em diferentes regiões geográficas e que hábitos de vida apresentam associações conflitantes com parâmetros seminais (BHONGADE et al., 2015; CENTOLA et al., 2016; LEVINE et al., 2022; LI et al., 2013). No Brasil, poucos estudos avaliaram a relação entre parâmetros espermáticos e populações não selecionadas quanto ao status de fertilidade. Portanto, esse estudo pode contribuir com a vigilância constante da saúde reprodutiva de homens brasileiros e integrar dados observados em demais regiões do globo, além de encontrar associações entre hábitos de vida e parâmetros seminais da população local.

Muitos laboratórios que incluem a análise de sêmen em sua rotina sofrem com a falta de padronização (BJÖRNDAHL et al., 2016). É indispensável que os métodos utilizados sejam válidos e que a amostra seja analisada no tempo correto. Diferentes câmaras de contagem de espermatozoides são utilizadas em laboratórios de andrologia apresentando resultados conflitantes quanto a intercambialidade dos resultados (BAILEY et al., 2007; CARDONA-MAYA; BERDUGO; CADAVID, 2008; IMADE et al., 1993). Pretendemos, dessa forma, contribuir para a decisão da escolha do melhor método de análise de concentração de espermatozoides.

O armazenamento da amostra de sêmen em diferentes condições de temperatura parece reduzir parâmetros do espermograma como motilidade e vitalidade em função do tempo. (SCHULTE et al., 2008). No entanto, não é claro qual o papel do dano à integridade da cromatina nesse processo. Nosso estudo visa, dessa maneira, responder se maior dano à integridade da cromatina espermática apresenta influência sobre a intensidade de declínio de parâmetros espermáticos em diferentes condições de armazenamento.

4 HIPÓTESES

4.1 HIPÓTESES NULAS

- Diferentes hábitos de vida não influenciam a qualidade dos parâmetros seminais;
- Parâmetros seminais não são influenciados por condições de armazenamento da amostra;
- Análises de concentração espermática com o hemocitômetro de Neubauer e com a câmara de Makler são intercambiáveis.

4.2 HIPÓTESES ALTERNATIVAS

- Diferentes hábitos de vida influenciam a qualidade dos parâmetros seminais;
- Parâmetros seminais são influenciados por condições de armazenamento da amostra;
- Análises de concentração espermática com o hemocitômetro de Neubauer e com a câmara de Makler não são intercambiáveis.

5 OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a qualidade do sêmen humano através do exame do espermograma.

5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Descrever os valores médios encontrados para cada parâmetro do espermograma e identificar a frequência de resultados alterados em uma população não selecionada quanto ao status de fertilidade;

Relacionar dados demográficos, hábitos de vida, percepção de estresse e eventos de vida estressantes obtidos por meio da resposta de questionários com parâmetros do espermograma, bem como ao dano à integridade da cromatina espermática;

Estudar a influência de condições de armazenamento e tempo para análise sobre os parâmetros de concentração, vitalidade e motilidade progressiva de espermatozoides e examinar as relações com outros parâmetros seminais;

Avaliar a precisão e a acurácia do hemocítômetro de Neubauer e da câmara de Makler como métodos de determinação de concentração de espermatozoides.

**CAPÍTULO 1. PARÂMETROS SEMINAIS
DA POPULAÇÃO DE ESTUDO E
RELAÇÃO COM HÁBITOS DE VIDA**

1 INTRODUÇÃO

As causas mais comuns para infertilidade masculina são fatores hormonais, testiculares ou obstrutivos. No entanto, em cerca de um terço dos pacientes, a causa é idiopática (WALL; JAYASENA, 2018). Hábitos de vida parecem influenciar a qualidade do sêmen. Estudos prévios mostraram associação entre prejuízo aos parâmetros espermáticos com estresse, calor excessivo, dependência do telefone celular, maior índice de massa corpórea (IMC), consumo de gordura saturada, consumo de álcool e hábito de fumar (AFEICHE et al., 2013; HARLEV et al., 2015; NORDKAP et al., 2016; TANG et al., 2015; ZHOU et al., 2020; ZILBERLICHT et al., 2015). Esses fatores contribuem com a formação intracelular de espécies reativas de oxigênio no sêmen (HOMA et al., 2015; MAYORGA-TORRES et al., 2017) e com dano ao ácido desoxirribonucleico (DNA) espermático (PANNER SELVAM et al., 2020). Por outro lado, estudos em populações diferentes mostram associações conflitantes entre esses fatores e parâmetros seminais (BHADORIA et al., 2020; KESKIN et al., 2016; MACDONALD et al., 2010; RICCI et al., 2017). Ademais, evidências apontam associação entre dano ao DNA espermático e dificuldade em alcançar a gravidez (AGARWAL; CHO; ESTEVES, 2016; MCQUEEN; ZHANG; ROBINS, 2019; SANTI; SPAGGIARI; SIMONI, 2018).

A redução média a nível global de 53% na concentração de espermatozoides da população geral entre 1973 e 2018, com declínio de 1,16% ao ano, é preocupante para o futuro da reprodução humana. Por outro lado, homens de diferentes regiões do planeta demonstram ter seus parâmetros seminais afetados de maneiras diferentes (LEVINE et al., 2022). Além disso, homens da América do Sul não foram incluídos na última atualização do manual da OMS para análise de sêmen (CAMPBELL et al., 2021; WHO, 2021), portanto, os limites de referência estabelecidos no manual não incluem dados brasileiros.

No Brasil, a concentração de espermatozoides sofreu redução de 44,1% a 56,7% nas últimas duas décadas (BACCARO et al., 2017; BORGES et al., 2015). No entanto, pacientes desses estudos foram recrutados em clínicas de fertilização, cujos resultados dos parâmetros espermáticos não necessariamente refletem os da população geral.

2 MÉTODOS

2.1 POPULAÇÃO

Foi realizado um estudo observacional transversal envolvendo a investigação de parâmetros do sêmen de alunos e colaboradores da Universidade Federal de Santa Catarina. A pesquisa foi divulgada no site “divulga UFSC” e cartazes (ANEXO A) foram espalhados por todo o campus universitário Reitor João David Ferreira Lima. Os indivíduos interessados em participar da pesquisa entraram em contato por e-mail ou telefone para agendamento da coleta de sêmen. A todos os participantes da pesquisa, foi aplicado questionário de forma online (Google LLC, Mountain View, EUA) com perguntas sobre dados demográficos e hábitos de vida (ANEXO B), escala de estresse percebido (ANEXO C) e inventário de eventos de vida estressantes (ANEXO D).

Ao final do questionário o participante respondeu se gostaria de realizar uma nova coleta caso algum dos parâmetros do sêmen demonstrasse alteração em relação aos limites de referência. Em caso de resposta positiva e de observação de alteração no espermograma, o participante foi contactado para agendar nova coleta. A coleta das amostras de sêmen ocorreu entre abril e setembro de 2022 no setor de análises clínicas do Hospital Universitário Professor Polydoro Ernani de São Thiago – HU/UFSC/EBSERH. As análises de sêmen foram realizadas no Laboratório de Citologia Clínica da Universidade Federal de Santa Catarina (LACIT – UFSC) e os resultados foram enviados para o e-mail fornecido pelos próprios participantes. Os participantes com alteração no espermograma após confirmação com segunda coleta (dois resultados alterados) receberam um documento de encaminhamento para a especialidade médica de urologia para que pudessem agendar uma consulta por meio da unidade básica de saúde e prosseguir com a investigação da condição clínica que levou à alteração.

Essa pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (CEPSH) da UFSC (ANEXO E), protocolo número 19806819.1.0000.0121. Todos os participantes foram abordados para esclarecimento dos objetivos do estudo e aqueles que aceitaram participar assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (ANEXO F).

2.2 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Homens entre 18 e 50 anos que se voluntariaram a participar do estudo, independentemente do status de fertilidade.

2.3 CRITÉRIOS DE NÃO INCLUSÃO

Homens com problemas de fertilidade com etiologia conhecida como produção ou função anormal de espermatozoides devido à criptorquidia, hipospádia, hipertireoidismo, hipotireoidismo, tratamentos hormonais com andrógenos, síndrome de Klinefelter e outras cromossomopatias, fibrose cística ou problemas obstrutivos nos ductos ejaculatórios e homens que não responderam ao questionário não foram incluídos da análise da relação entre parâmetros do sêmen e hábitos de vida.

2.4 COLETA E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS

As amostras de sêmen foram coletadas em recipiente de boca larga por meio de masturbação em um banheiro adjacente ao laboratório de análises clínicas do HU/UFSC/EBSERH após abstinência sexual de 2 a 7 dias. Imediatamente após a ejaculação, a amostra foi transportada em bolsa térmica para análise no Laboratório de Citologia Clínica (LACIT), localizado no Centro de Ciências da Saúde da UFSC. Todas as etapas de análise da amostra foram realizadas de acordo com a 6ª edição do manual de laboratório da Organização Mundial da Saúde (OMS) para o exame e processamento do sêmen humano (WHO, 2021).

No laboratório, a amostra foi colocada em estufa a 37°C e o aspecto da amostra foi analisado de 5 em 5 minutos para contabilizar o tempo de liquefação. Após observação da completa liquefação da amostra, os parâmetros macroscópicos foram averiguados antes de prosseguir para as análises microscópicas. Durante o processamento da amostra foram utilizadas pipetas Labmate Pro (HTL SA, Varsóvia, Polônia) para transferência de sêmen e diluentes e um microscópio de campo claro Olympus CX41 (Olympus, Tóquio, Japão) foi utilizado para as análises microscópicas. Além disso, fotomicrografias dos espermatozoides foram obtidas a partir de um software (MotiCyte versão 2; Motic, Xiamen, China) acoplado ao

microscópio (Motic BA410™) e câmera de vídeo colorida (Moticam Pro 285A™; 1.4 megapixels, 1360 x 1024 pixels).

2.5 QUESTIONÁRIOS

2.5.1 Hábitos de vida

O questionário completo está contido no ANEXO B. O link com as perguntas do questionário foi enviado para os participantes para que eles pudessem responder de maneira autônoma um dia antes da coleta de sêmen. Foram coletadas informações quanto a: idade, peso, altura, escolaridade, estado civil, consumo de tabaco, consumo de álcool, uso do celular, infecções sexualmente transmissíveis, doenças crônicas, uso de medicamentos, cirurgia pélvica, atividade física, prática de ciclismo, infecção por COVID-19, tempo entre infecção por COVID-19 e coleta do sêmen, sintomas graves ou hospitalização devido a infecção de COVID-19, frustração com infertilidade, infertilidade na família e condições clínicas que poderiam afetar a qualidade do sêmen.

2.5.2 Escala de estresse percebido

Para a análise de estresse percebido foi utilizada a escala de estresse percebido de Cohen (COHEN; KAMARCK; MERMELSTEIN, 1983) que foi traduzida e validada para o português previamente (LUFT et al., 2007). A escala possui dez questões com opções de zero a quatro (0 = nunca; 1 = quase nunca; 2 = às vezes; 3 = quase sempre; 4 = sempre) (ANEXO C). Nas questões em que a conotação na pergunta é positiva (4, 5, 7, 8) a pontuação é somada de forma invertida, 0 = 4, 1 = 3, 2 = 2, 3 = 1 e 4 = 0. Nas demais questões com conotação negativa a soma deve ser feita diretamente. Após a soma, a pontuação final pode variar de 0 a 40. Quanto maior a pontuação, maior o nível de estresse percebido.

2.5.3 Inventário de eventos de vida estressantes

Os participantes preencheram uma versão abreviada do Inventário de Eventos de Vida estressantes (COCHRANE; ROBERTSON, 1973) validada para o português (LOPES; FAERSTEIN, 2001; RIZZINI; SANTOS; SILVA, 2018). Os participantes responderam oito perguntas fechadas, com respostas dicotômicas (sim ou não) sobre três dimensões relacionadas à saúde, aos aspectos pessoais e financeiros e à violência, com a pontuação variando de 0 a 8 (ANEXO D).

2.6 EXAME MACROSCÓPICO

2.6.1 Volume

A análise de volume foi feita por meio de pesagem em balança analítica. O recipiente identificado com as iniciais do participante foi pesado antes da coleta. Após a coleta, o recipiente com sêmen foi pesado e o peso foi subtraído do peso do recipiente vazio para determinação do volume, uma vez que a densidade do sêmen é próxima de 1 g/ml (WHO, 2021). Como os recipientes vazios poderiam ter variação de peso, cada recipiente foi pesado de maneira individualizada para cada participante. A avaliação de volume foi realizada dessa forma uma vez que a transferência da amostra do recipiente de coleta para cilindros graduados pode levar a subestimação de cerca de 0,5 ml do volume (BORGES et al., 2015; COOPER et al., 2007).

2.6.2 Tempo de liquefação

A liquefação do sêmen humano é um processo proteolítico que muda o sêmen de um coágulo semelhante a gel para uma consistência aquosa (liquefeito) e é regido principalmente por semenogelinas e pela atividade enzimática de calicreína derivada da próstata (ANAMTHATHMAKULA; WINUTHAYANON, 2020). A ejaculação, coagulação e liquefação do sêmen formam uma cascata sincronizada que primeiro protege os espermatozoides do pH ácido da vagina e em seguida, com

a liquefação, permite a motilidade necessária para serem transportados para o trato reprodutivo feminino superior para a fertilização (VERZE; CAI; LORENZETTI, 2016).

A liquefação completa do sêmen normalmente ocorre em 15 a 30 minutos após a ejaculação. Movimentos lentos e giratórios do recipiente da amostra foram realizados de 5 em 5 minutos para facilitar a liquefação. O sêmen foi considerado liquefeito quando adquiriu um aspecto homogêneo com o total desaparecimento dos coágulos na amostra (WHO, 2021). O tempo para esse processo foi anotado.

2.6.3 Aspecto e cor

Um ejaculado liquefeito normal tem um aspecto homogêneo de coloração creme/acinzentada ou branca opalescente. O sêmen pode parecer menos opaco se a concentração de espermatozoides for muito baixa. Além disso, a coloração pode variar após longos períodos de abstinência assumindo uma coloração levemente amarelada, uma coloração vermelho-acastanhada quando há hemácias (hemospermia) ou alaranjada em pacientes com icterícia ou que estão fazendo uso de certos medicamentos (VASAN, 2011; WHO, 2021).

2.6.4 pH

O pH do sêmen é influenciado pela contribuição relativa da secreção prostática ácida e da secreção vesicular seminal alcalina. Na *análise in vitro* ocorre a perda contínua de CO₂, que gradualmente eleva o pH. Além disso, a acidez no pH pode resultar na redução da motilidade espermática (ZHOU et al., 2015). Portanto, a avaliação do pH foi feita preferencialmente após 30 minutos da coleta, mas não mais do que 1 hora para determinação correta do pH. Um valor de pH abaixo de 7,2 pode ser indicativo de falta de fluido vesicular seminal alcalino. Também pode ser devido à contaminação da urina (WHO, 2021).

Após mistura da amostra com movimentos lentos e giratórios, 1 gota do sêmen foi colocada sobre papel indicador de pH com faixa de 1,0 a 14,0 (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha) e a leitura foi feita comparando a cor obtida com a faixa de calibração.

2.6.5 Viscosidade

A viscosidade foi avaliada após a liquefação da amostra. A análise foi feita com uma pipeta plástica descartável de material não tóxico para os espermatozoides. Depois de aspirada, a amostra foi liberada da pipeta pela ação da gravidade observando o comprimento do fio formado. Em amostras com viscosidade normal, o ejaculado se desprende da pipeta em pequenas gotas. Em amostras com viscosidade aumentada, a gota forma um fio com comprimento superior a 2 cm. A frequência de hiperviscosidade do sêmen é estimada entre 12 e 29% e pode levar à infertilidade masculina *in vivo* e *in vitro*. A hipofunção da próstata ou das vesículas seminais pode causar viscosidade anormal do fluido seminal. Infecção e concentrações elevadas de leucócitos também podem resultar no aumento da viscosidade. A hiperviscosidade prejudica o movimento normal dos espermatozoides no trato reprodutivo feminino e pode levar à diminuição da contagem de espermatozoides (DU PLESSIS; GOKUL; AGARWAL, 2013).

2.7 EXAME MICROSCÓPICO

2.7.1 Concentração

A concentração do espermatozoides no hemocítmetro de Neubauer foi estimada de acordo com os parâmetros estabelecidos pela OMS (WHO, 2021).

2.7.2 Contagem total

O cálculo do número total de espermatozoides foi obtido por meio da multiplicação da concentração de espermatozoides determinada no hemocítmetro de Neubauer pelo volume total do ejaculado.

2.7.3 Motilidade

A investigação de motilidade deve ser feita logo após a liquefação e não deve ultrapassar o limite de uma hora. As análises de motilidade foram realizadas na

câmara de Makler (MAKLER, 1980). A motilidade dos espermatozoides foi observada em aumento de 200x e os espermatozoides móveis em 10 quadrantes foram contabilizados e classificados de acordo com o tipo de movimento. O manual da OMS recomenda que os espermatozoides sejam classificados em quatro categorias de acordo com o tipo de motilidade (WHO, 2021). São elas:

- Espermatozoides com motilidade progressiva rápida (categoria A): movimento ativo, linear ou em grande círculo com velocidade de 25 $\mu\text{m/s}$;
- Espermatozoides com motilidade progressiva lenta (categoria B): movimento ativo, linear ou em grande círculo com velocidade de 5 a 25 $\mu\text{m/s}$;
- Espermatozoides com motilidade não progressiva (categoria C): possuem todos os padrões de movimentação ativa de cauda, mas ausência de progressão ou velocidade inferior a 5 $\mu\text{m/s}$;
- Espermatozoides imóveis: não possuem movimento.

A porcentagem de motilidade em cada categoria foi realizada de maneira sistemática, iniciando-se com os espermatozoides de progressão rápida e lenta, seguidos da determinação de espermatozoides com motilidade não progressiva e, por fim, dos espermatozoides imóveis.

Além das categorias individuais, os tipos de motilidade também foram classificados em motilidade progressiva (categoria A+B) e motilidade total (categoria A+B+C).

2.7.4 Vitalidade

A avaliação de vitalidade baseia-se no princípio de que a coloração de eosina passa somente através da membrana plasmática danificada de células mortas, ao passo que em células viáveis a membrana é intacta e não permite a passagem do corante. A coloração de nigrosina é utilizada como contraste (Figura 4).

Em um tubo de hemólise, 1 gota de eosina foi misturada a 20 μL de sêmen. Após 30 segundos, 2 gotas de nigrosina foram adicionadas à mistura. Após a

confeção do esfregaço, 200 células foram contadas para o cálculo da vitalidade e o resultado foi dado em porcentagem de espermatozoides vivos em relação a mortos. Espermatozoides vivos não se coram, enquanto espermatozoides mortos se coram em rósea (BJÖRNDAHL; SÖDERLUND; KVIST, 2003).

Figura 4 – Determinação de vitalidade



Fonte: Imagem elaborada no Laboratório de Citologia Clínica da Universidade Federal de Santa Catarina (LACIT – UFSC) com amostra do estudo.

Legenda: Espermatozoides vivos não se coram, enquanto espermatozoides mortos se coram em rósea devido a penetração de eosina através da membrana plasmática do espermatozoide morto, foto obtida em aumento de 1000x.

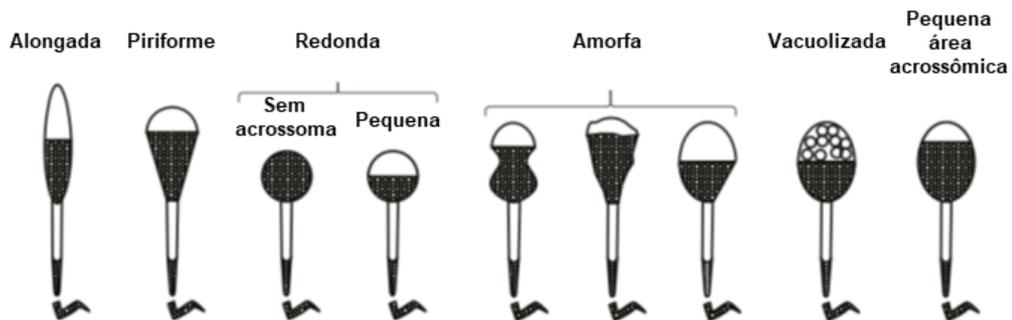
2.7.5 Morfologia

A avaliação do espermatozoide deve ser feita quanto ao formato da cabeça, da peça intermediária, da cauda e da presença de citoplasma residual (Figura 5). Uma cabeça “normal” tem uma forma oval com contornos suaves. O Acrossoma é claramente visível, bem definido, e exibe uma coloração azul clara homogênea cobrindo de 40 a 70% da porção anterior da cabeça. A peça intermediária deve carecer de resíduos citoplasmáticos e deve ser fixa axialmente à cabeça, sem formar ângulos. A cauda também não deve ter resíduos citoplasmáticos, deve ser inserida apicalmente na extremidade pós-acrossomal da peça intermediária, ter comprimento de aproximadamente 40 a 50 μm e não ter curvas acentuadas (DANIS; SAMPLASKI, 2019).

Para preparação do esfregaço, a amostra foi diluída na proporção de 1:2 em PBS e centrifugada a 1.500 RPM por 15 minutos. O sobrenadante foi descartado e a amostra ressuspensa em PBS. Uma alíquota de 20 μ L do sêmen lavado foi depositado sobre lâmina limpa e o esfregaço preparado. O esfregaço foi seco ao ar por cerca de 5 minutos. Após secagem ao ar, a lâmina foi fixada em etanol 96% por 30 minutos antes de ser corada pelo método de Papanicolaou (Figura 6). A lâmina foi examinada com microscopia ótica de campo claro na ampliação de 1000x com óleo de imersão. Cerca de 200 espermatozoides foram avaliados para determinar a porcentagem de formas normais e de formas anormais

Figura 5 – Classificação de anormalidades morfológicas de espermatozoides

Anormalidades de cabeça



Anormalidades de peça intermediária



Anormalidades de cauda



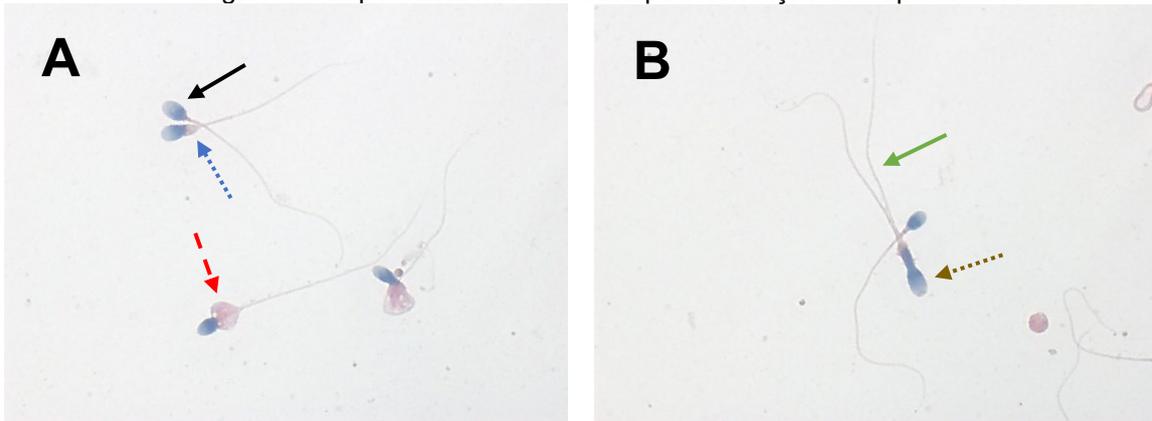
Excesso residual de citoplasma

> 1/3 da cabeça



Fonte: Adaptado da OMS (WHO, 2021)

Figura 6 – Espermatozoides corados pela coloração de Papanicolaou



Fonte: Imagens elaboradas no Laboratório de Citologia Clínica da Universidade Federal de Santa Catarina (LACIT – UFSC) com amostras do estudo.

Legenda: (A) espermatozoide normal (seta preta sólida), espermatozoide com peça intermediária espessa (seta azul pontilhada) e espermatozoide com excesso de citoplasma residual (seta vermelha traçada); (B) mesmo espermatozoide com cauda dupla (seta verde pontilhada) e cabeça amorfa (seta marrom traçada). Foto obtida em aumento de 1000x.

2.7.6 Diferenciação de células redondas

Em conjunto com a avaliação da morfologia dos espermatozoides no esfregaço corado por Papanicolaou, demais células (células imaturas, células epiteliais e leucócitos) foram determinadas. O cálculo foi dado por $C = S \times (N/400)$, onde C é a concentração de células ($10^6/\text{ml}$), S é a concentração estimada de espermatozoides ($10^6/\text{ml}$) contados na câmara de Neubauer e N é o número de células observadas ao contar 400 espermatozoides (WHO, 2021).

2.8 DANO À INTEGRIDADE DA CROMATINA

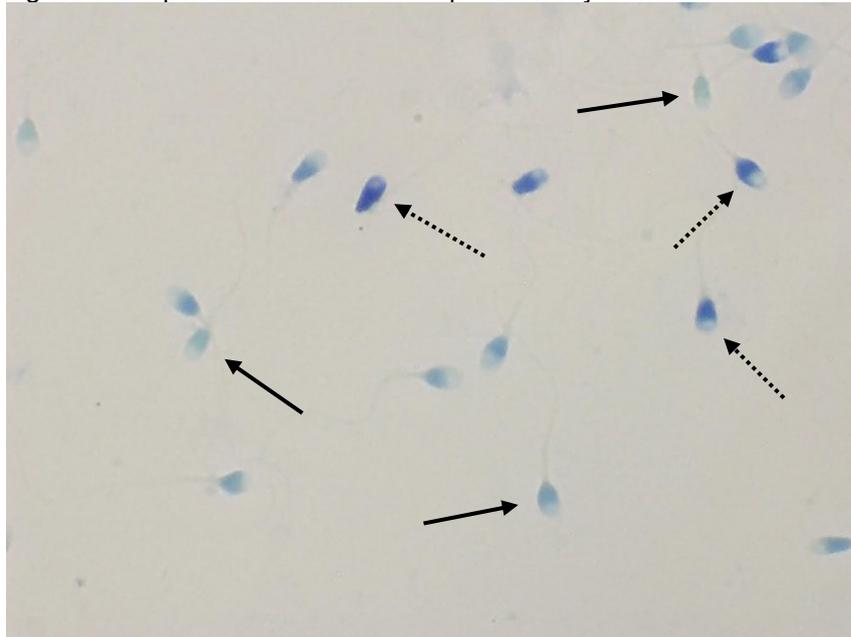
O azul de toluidina é um corante nuclear básico usando para coloração da cromatina. Resíduos de fosfato no DNA de espermatozoides em núcleos com cromatina frouxamente compactada ou DNA prejudicado tornam-se suscetíveis à ligação com o corante básico azul de toluidina, proporcionando uma alteração metacromática devido à dimerização das moléculas do corante de azul claro para azul escuro (ERENPREISA et al., 2003).

Após liquefação, as amostras foram lavadas com PBS e centrifugadas a 1.500 RPM por 15 minutos. O sobrenadante foi descartado e a amostra ressuspensa em PBS. Esfregaços finos foram preparados em lâminas limpas e depois secos ao ar por 5 minutos antes de serem fixadas com etanol 96%:acetona

(1:2) a 4°C por 30 minutos. Após fixação as lâminas foram secas ao ar e armazenadas em temperatura ambiente por no mínimo 12 horas antes de prosseguir com a coloração. Para coloração, hidrólise foi realizada com HCl 0,1 N 4°C por 5 minutos, seguido de três banhos com água destilada por 2 minutos cada. Coloração com azul de toluidina 0,05% em tampão citrato fosfato de McIlvaine 50% (pH 3,5) foi aplicada por 15 minutos. As lâminas foram então brevemente lavadas em água destilada e secas ao ar (ERENPREISA et al., 2003).

A qualidade da cromatina dos espermatozoides foi determinada de acordo com a coloração metacromática das cabeças com auxílio de microscopia de luz com aumento de 1000x contando 300 espermatozoides e calculando o resultado em porcentagem. As cabeças dos espermatozoides coradas em azul claro foram consideradas normais e os espermatozoides azul escuro foram categorizados com dano à integridade da cromatina (Figura 7).

Figura 7 – Espermatozoides corados pela coloração de azul de toluidina



Fonte: Imagem elaborada no Laboratório de Citologia Clínica da Universidade Federal de Santa Catarina (LACIT – UFSC) com amostra do estudo.

Legenda: Espermatozoides sem danos à integridade da cromatina se coram em azul claro (seta preta sólida); espermatozoide com danos à integridade da cromatina se coram em azul escuro (seta preta pontilhada). Foto obtida em aumento de 1000x.

2.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Médias, desvios-padrões, intervalos de confiança de 95%, medianas e percentis foram usadas para as descrições básicas. As análises estatísticas foram realizadas com o software SPSS® versão 22,0 (SPSS Inc., Chicago, Estados Unidos da América). O teste de Shapiro-Wilk foi utilizado para verificar a normalidade dos dados e as diferenças estatisticamente significativas foram definidas como $p < 0,05$.

Os desfechos de interesse no estudo foram parâmetros espermáticos como volume, concentração, contagem total, motilidade, vitalidade e morfologia e dano à integridade da cromatina. Primeiro, coeficientes de correlação de postos de Spearman foram calculados para averiguar a força de correlação entre os parâmetros do sêmen. Em seguida, hábitos de vida dos participantes foram investigados para verificar a relação com os parâmetros espermáticos por meio do teste U de Mann-Whitney. Além disso, também foram calculadas razões de chance e intervalos de confiança de 95% para estimar a probabilidade de classificação abaixo dos limites de referência da OMS para os parâmetros do espermograma com base nos hábitos de vida. Os parâmetros do sêmen com distribuição não normal foram transformados com obtenção da raiz quadrada dos valores para que pudessem ser inseridos nos modelos de regressão linear como variáveis dependentes. As análises de regressão linear foram avaliadas de maneira simples e com ajustes para cofatores para verificar associação entre parâmetros do sêmen e indicadores de estresse.

2.9.1 Cálculo amostral

Para o cálculo do tamanho da amostra foi levado em consideração o desenho de estudo transversal e a proporção de infertilidade masculina na população geral. Considerando que 12% dos casais apresentam infertilidade conjugal globalmente e que o fator masculino contribui em 50% dos casos, a prevalência estimada de alteração nos parâmetros espermáticos foi de 6% (AGARWAL et al., 2015). O nível de confiança estabelecido foi de 95% e o erro absoluto de 5%. Com base nesses dados, a seguinte fórmula foi utilizada para o cálculo (CHARAN; BISWAS, 2013):

$$\text{Tamanho da amostra} = \frac{Z_{1-\alpha/2}^2 p(1-p)}{d^2}$$

no qual, $Z_{1-\alpha/2}$ é o padrão normal de variação (com 5% de erro do tipo 1 ($p < 0,05$) o valor é de 1,96), p é a proporção esperada na população com base em estudos anteriores e d é o erro absoluto.

Dessa forma, o tamanho da amostra foi calculado como:

$$\text{Tamanho da amostra} = \frac{1,96^2 \times 0,06 (1 - 0,06)}{0,05^2}$$

$$\text{Tamanho da amostra} = 86,7$$

Portanto, o número mínimo de participantes para o estudo foi definido como 87.

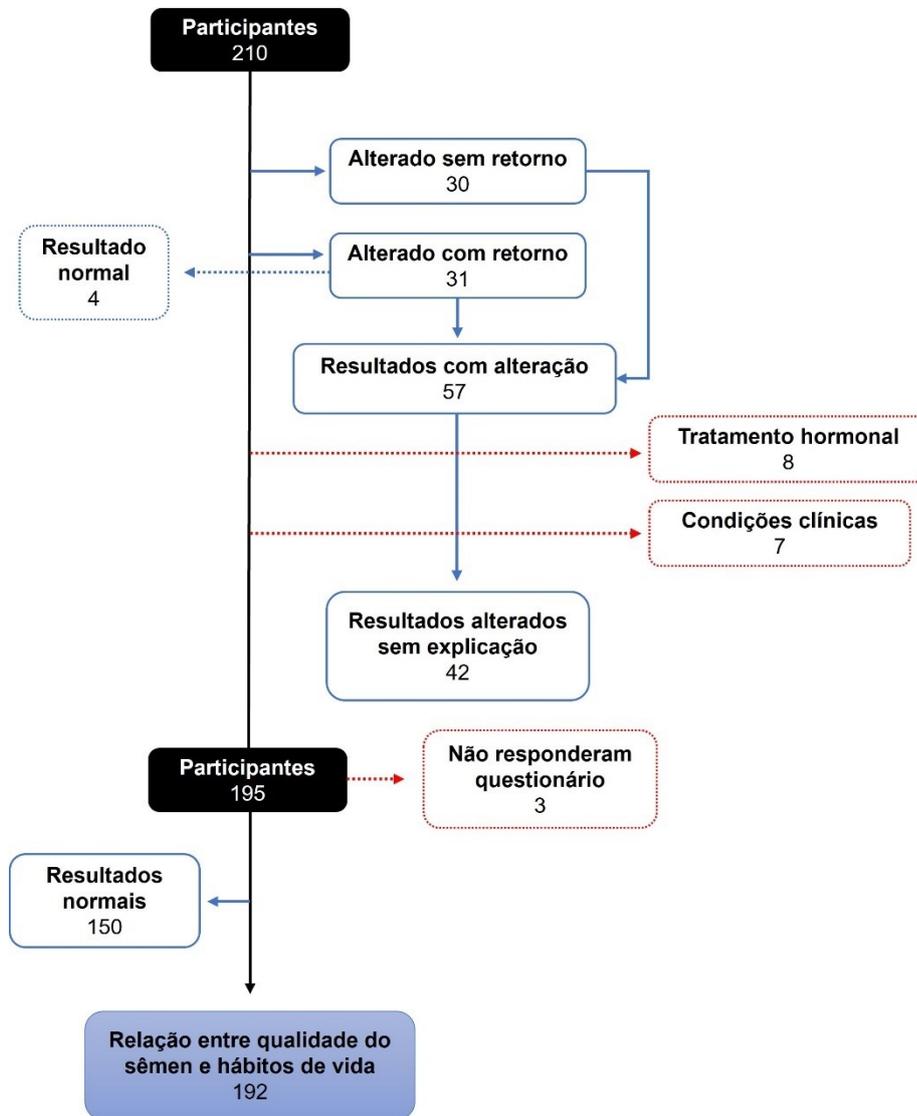
3 RESULTADOS

3.1 POPULAÇÃO

O fluxograma de inclusão dos participantes no estudo está exemplificado na figura 8. Ao todo, 210 participantes aceitaram participar da pesquisa. Desses, 61 (29,0%) apresentaram alteração em algum parâmetro do espermograma e foram contactados para fornecer uma segunda amostra em nova coleta para confirmar o resultado. Apenas um dos resultados dos participantes com recoleta foi incluído na análise de relação entre hábitos de vida e parâmetros do sêmen. A escolha entre os dois resultados foi dada pelo maior valor obtido para o parâmetro alterado no primeiro exame. Por exemplo, se o resultado de concentração de espermatozoides na primeira coleta foi de $10,0 \times 10^6/\text{ml}$ e na segunda coleta foi de $9,0 \times 10^6/\text{ml}$, o resultado do espermograma incluído na análise foi o da primeira coleta.

Dos 61 participantes chamados para recoleta, 31 retornaram ao laboratório, porém 30 optaram por não fornecer nova amostra. Dos 31 participantes que realizaram novo exame, 27 resultados foram confirmados como alterados, no entanto, 4 apresentaram resultado acima do limite de referência para o parâmetro do espermograma previamente alterado e foram reclassificados como resultados normais. Dessa forma, 57 (27,1%) dos 210 participantes no estudo apresentaram resultado alterado no espermograma. Porém, ao analisar as respostas do questionário desses participantes, verificou-se que 5 (2,38%) faziam uso do medicamento finasterida, 3 (1,43%) faziam reposição de testosterona, 3 (1,43%) relataram diagnóstico de criptorquidia, 2 (0,95%) relataram diagnóstico de hipospádia e 2 (0,95%) relataram diagnóstico de hipotireoidismo, resultando em 42 (20,0%) participantes com resultado alterado sem explicação aparente. Ademais, 3 participantes não responderam os questionários e foram excluídos da análise. Portanto, para a investigação da relação entre hábitos de vida e qualidade do sêmen, 192 participantes foram analisados.

Figura 8 – Fluxograma do estudo



Fonte: Elaborado pela autora.

Legenda: Linhas sólidas indicam participantes incluídos nas análises. Linhas pontilhadas em vermelho indicam participantes que foram retirados das análises.

3.2 ESPERMOGRAMA

Os resultados de espermograma são baseados nos 192 participantes incluídos na análise da relação entre qualidade do sêmen e hábitos de vida e estão detalhados na tabela 1. Para algumas análises como motilidade, morfologia, vitalidade e dano à integridade da cromatina a análise foi realizada somente em 189 amostras que tinham presença de espermatozoides, já que 3 participantes apresentaram azoospermia. De forma geral, as médias dos parâmetros espermáticos estavam acima dos limites de referência estabelecidos pela OMS

como valores normais, com exceção do número de células que deve estar abaixo dos limites para serem considerados normais.

A média de volume no estudo foi de 3,14 ml, a de concentração foi de $64,7 \times 10^6$ /ml, a de contagem total de espermatozoides foi de $184,9 \times 10^6$, a de motilidade progressiva foi de 47,4%, a de vitalidade foi de 66,4% e a de morfologia normal foi de 14,1%. Além desses parâmetros que habitualmente são considerados os mais importantes para a análise do espermograma, também foi avaliado o índice de dano à integridade na cromatina, que apresentou média de 23,1% no estudo, variando de 2,0 a 96,0%.

Verificou-se na análise de diferenciação do número total de células redondas que a média para presença de células germinativas ($0,73 \times 10^6$ /ml) foi maior do que a média de leucócitos ($0,17 \times 10^6$ /ml) e do que a média de células epiteliais ($0,03 \times 10^6$ /ml).

Dos 192 participantes analisados, 150 (78,1%) não apresentaram alteração em nenhum parâmetro espermático, já 42 (21,9%) participantes apresentaram alteração em ao menos um parâmetro (tabela 2). O parâmetro do sêmen que apresentou maior frequência de alteração no estudo foi concentração de espermatozoides com 29 (15,1%) participantes apresentando valores inferiores a $16,0 \times 10^6$ /ml. O parâmetro com menor frequência de alteração foi o volume de sêmen com 14 (7,3%) participantes apresentando volume seminal inferior a 1,4 ml.

Tabela 1 – Resultados da análise do sêmen

Parâmetro seminal	Limites de referência	Média	DP	Mínimo	Máximo	Mediana
Tempo de abstinência (dias)	2 a 7	3,42	1,26	2,0	7,0	3,0
Tempo de liquefação (minutos)	< 1 hora	33,4	7,3	10,0	55,0	30,0
Volume (ml)	≥ 1,4	3,14	1,49	0,40	7,9	3,00
pH	≥ 7,2	7,7	0,30	7,5	9,0	7,5
Concentração (10 ⁶ /ml)	≥ 16,0	64,7	59,5	0,0	325,3	48,6
Contagem total (10 ⁶)	≥ 39,0	184,9	159,8	0,0	875,9	151,5
Motilidade (%) ^a						
• Progressiva rápida (a)	-	21,6	13,3	0,0	60,0	19,0
• Progressiva lenta (b)	-	25,7	10,4	6,0	55,0	25,0
• Não Progressiva (c)	-	11,4	4,0	0,0	24,0	11,0
• Imóveis (d)	-	41,2	13,1	15,0	86,0	50,0
• Motilidade progressiva (a+b)	≥ 30,0	47,4	13,0	6,0	75,0	47,0
• Motilidade total (a+b+c)	≥ 42,0	58,8	13,1	14,0	85,0	60,0
Morfologia (%) ^a						
• Normais	≥ 4,0	14,1	7,2	1,0	38,5	13,5
• Anormais	-	85,9	7,2	61,5	99,0	86,5
➤ Defeito em cabeça	-	85,9	7,2	61,5	99,0	86,5
➤ Defeito em peça intermediária	-	16,0	6,4	2,5	39,0	15,5
➤ Defeito em cauda	-	7,3	4,8	0,50	26,5	6,5
➤ Excesso de citoplasma residual	-	2,07	1,87	0,0	11,5	1,50
Vitalidade (%) ^a						
• Vivos	≥ 54,0	66,4	14,0	0,0	88,0	68,0
• Mortos	-	32,0	11,9	0,0	76,0	32,0
Hemácias (10 ⁶ /ml)	< 1,00	0,71	0,64	0,15	7,5	0,60
Total de células redondas (10 ⁶ /ml)	< 1,00	0,93	1,20	0,0	10,4	0,59
• Leucócitos	-	0,17	0,57	0,0	6,0	0,0
• Células germinativas	-	0,73	1,10	0,0	10,4	0,40
• Células epiteliais	-	0,03	0,09	0,0	0,60	0,0
Dano à integridade da cromatina ^a	-	23,1	13,3	2,0	96,0	19,8

Fonte: elaborado pela autora.

Legenda: ^a Análises com base em amostras com presença de espermatozoides (189 amostras). Demais análises em 192 amostras. Limites de referência com base nos limites estabelecidos pela 6^a edição do manual da OMS para análise de sêmen (WHO, 2021). DP = desvio padrão.

Tabela 2 – Classificação dos parâmetros seminais em relação limites de referência estabelecidos pela Organização Mundial da Saúde

Parâmetro seminal	Valor de referência	Classificação acima do valor de referência, n (%)	Classificação abaixo do valor de referência, n (%)
Concentração (10 ⁶ /ml)	≥ 16,0	163 (84,9)	29 (15,1)
Contagem total (10 ⁶ /ml)	≥ 39,0	164 (85,4)	28 (14,6)
Motilidade progressiva (a+b) ^a	≥ 30,0	172 (91,0)	17 (9,0)
Motilidade não progressiva (a+b+c) ^a	≥ 42,0	173 (91,5)	16 (8,5)
Morfologia (%) ^a	≥ 4,0	173 (91,5)	16 (8,5)
Vitalidade (%) ^a	≥ 45,0	174 (92,1)	15 (7,9)
Volume (ml)	≥ 1,4	178 (92,7)	14 (7,3)

Fonte: elaborado pela autora.

Legenda: ^a Análises com base em amostras com presença de espermatozoides (189 amostras). Demais análises em 192 amostras. Valores de referência com base no manual de análise de sêmen da Organização Mundial da Saúde (WHO, 2021)

Coefficientes de correlação foram calculados para averiguar a força de correlação entre os parâmetros do sêmen (Tabela 3). Correlação positiva significativa foi averiguada entre os parâmetros de concentração, contagem total, vitalidade, motilidade (progressiva e total) e morfologia normal ($p < 0,0001$). O parâmetro de volume demonstrou correlação positiva apenas para o parâmetro de contagem total (coeficiente = 0,346; $p < 0,0001$), o que é esperado já que o cálculo de contagem total depende diretamente do volume. Volume não demonstrou ter relação com os demais parâmetros espermáticos.

Dano à integridade da cromatina demonstrou correlação negativa com os parâmetros de vitalidade (coeficiente = - 0,161, $p = 0,029$), motilidade progressiva (coeficiente = - 0,151; $p = 0,042$), motilidade total (coeficiente = - 0,196; $p = 0,008$) e morfologia normal (coeficiente = - 0,209; $p = 0,005$). Avaliando os defeitos morfológicos individualmente, verificou-se que dano à integridade da cromatina apresentou correlação positiva significativa somente com o parâmetro de defeito da cabeça dos espermatozoides (coeficiente = 0,209, $p = 0,005$), mas não com defeito de peça intermediária (coeficiente = - 0,092, $p = 0,218$), defeito de cauda (coeficiente = 0,103, $p = 0,167$) ou excesso de citoplasma residual (coeficiente = 0,063, $p = 0,401$).

Tabela 3 – Correlações entre os parâmetros espermáticos

	Volume (ml)	Concentração (10 ⁶ /ml)	Contagem total (10 ⁶ /ml)	Vitalidade (%)	Motilidade progressiva (a+b) (%)	Motilidade total (a+b+c) (%)	Espermatozoides normais (%)	Dano à integridade da cromatina (%)
Volume (ml)	1,00							
Concentração (10 ⁶ /ml)	- 0,119 (0,100)	1,00						
Contagem total (10 ⁶ /ml)	0,346 (< 0,0001)	0,868 (< 0,001)	1,00					
Vitalidade (%)	- 0,046 (0,530)	0,294 (< 0,001)	0,256 (< 0,001)	1,00				
Motilidade progressiva (a+b) (%)	- 0,052 (0,474)	0,285 (< 0,0001)	0,265 (< 0,0001)	0,768 (< 0,001)	1,00			
Motilidade total (a+b+c) (%)	- 0,045 (0,539)	0,287 (< 0,0001)	0,275 (< 0,0001)	0,813 (< 0,001)	0,948 (< 0,0001)	1,00		
Espermatozoides normais (%)	- 0,020 (0,780)	0,273 (< 0,0001)	0,253 (< 0,0001)	0,431 (< 0,001)	0,421 (< 0,0001)	0,435 (< 0,0001)	1,00	
Dano à integridade da cromatina (%)	- 0,098 (0,186)	0,045 (0,543)	- 0,12 (0,871)	- 0,161 (0,029)	- 0,151 (0,042)	- 0,196 (0,008)	- 0,209 (0,005)	1,00

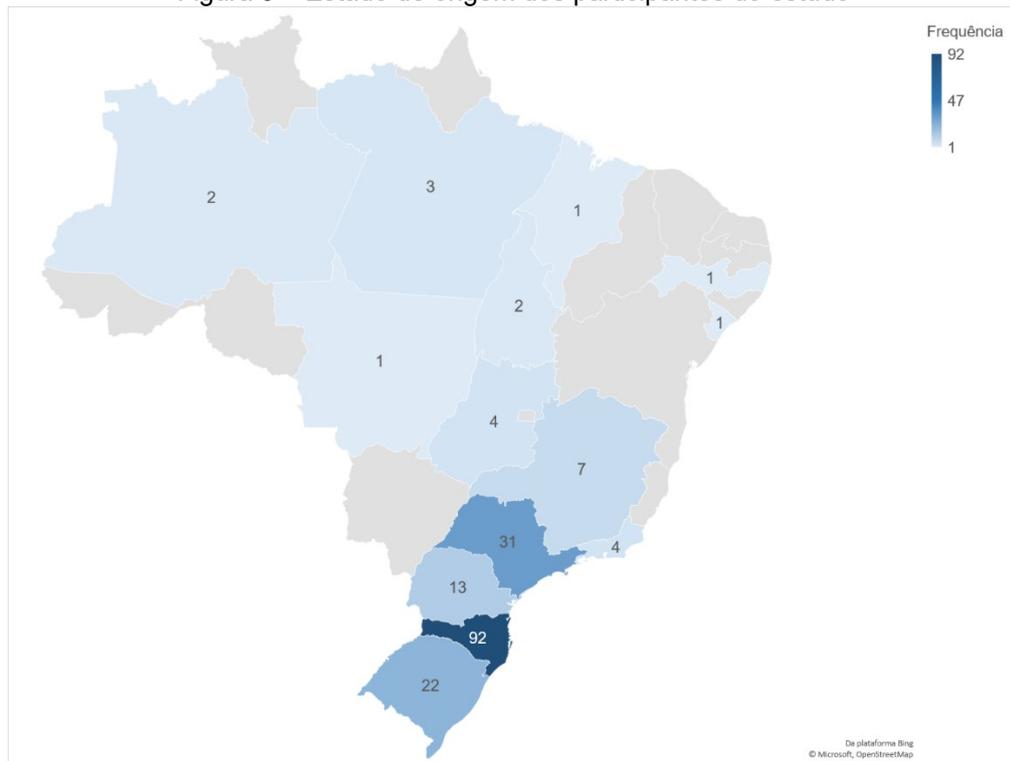
Fonte: elaborado pela autora.

Legenda: As diferenças significativas entre os grupos foram determinadas com análise de coeficientes de correlação de postos de Spearman, $p < 0,05$.

3.3 RELAÇÃO ENTRE QUALIDADE DO SÊMEN E HÁBITOS DE VIDA

A maioria dos participantes do estudo nasceram no estado de Santa Catarina (47,9%), porém participantes originários de outros estados (Figura 9), bem como de outros países (Tabela 4) fizeram parte da pesquisa. Todos estavam morando em Santa Catarina no momento da pesquisa.

Figura 9 – Estado de origem dos participantes do estudo



Fonte: Elaborado pela autora.

Legenda: 92 (47,9%) participantes do estudo nasceram no estado de Santa Catarina, 31 (16,1%) em São Paulo, 22 (11,5%) Rio Grande do Sul, 13 (6,8%) no Paraná, 7 (3,6%) em Minas Gerais, 4 (2,1%) em Goiás, 4 (2,1%) no Rio de Janeiro, 3 (1,6%) no Pará, 2 (1,0%) no Amazonas, 2 (1,0%) em Tocantins, 1 (0,5%) no Maranhão, 1 (0,5%) no Mato Grosso, 1 (0,5%) em Pernambuco e 1 (0,5%) em Sergipe.

Tabela 4 – País de origem dos participantes do estudo

País	Frequência
Angola	3
Argentina	1
Brasil	184
Colômbia	2
Espanha	1
Uruguai	1

Fonte: Elaborado pela autora.

As características da população do estudo estão descritas na Tabela 5. Participantes responderam perguntas sobre hábitos de vida que foram hipotetizados ter relação com parâmetros do sêmen.

Tabela 5 – Características da população do estudo (continua)

Característica	Resultados
Idade, média (DP)	26,4 (6,5)
• Idade < 25, n (%)	96 (50,0)
• Idade ≥ 25, n (%)	96 (50,0)
IMC (kg/m ²), média (DP)	23,9 (3,9)
• IMC (kg/m ²) < 25, n (%)	128 (66,7)
• IMC (kg/m ²) ≥ 25, n (%)	64 (33,3)
Escolaridade, n (%)	
• Ensino superior completo	71 (37,0)
• Ensino superior incompleto	113 (58,9)
• Ensino médio completo	7 (3,6)
• Ensino médio incompleto	1 (0,5)
Estado civil, n (%)	
• Solteiro	151 (78,6)
• Casado	41 (21,4)
Consumo de tabaco, n (%)	
• Não	166 (86,5)
• Sim	26 (13,5)
Número de cigarros por dia por quem fuma, média (DP)	2,54 (2,06)
Frequência de consumo de álcool, n (%)	
• Não consome	34 (17,7)
• 1 vez na semana	87 (45,3)
• 2 vezes na semana	57 (29,7)
• de 3 a 4 vezes na semana	12 (6,3)
• 5 ou mais vezes na semana	2 (1,0)
Frequência do uso de celular, n (%)	
• Menos de 5 horas por dia	112 (58,3)
• Mais de 5 horas por dia	80 (41,7)
Celular fica no bolso, n (%)	
• Não	32 (16,7)
• Sim	160 (83,3)
IST no último ano, n (%)	
• Não	175 (91,1)
• Sim	17 (8,9)
Doença crônica, n (%)	
• Não possui doença crônica	151 (78,7)
• Depressão	17 (8,9)
• Asma	10 (5,2)
• Hipercolesterolemia	3 (1,6)

Tabela 5 – Características da população do estudo (conclusão)

Característica	Resultados
• Hipertensão	3 (1,6)
• Psoríase	2 (1,0)
• TDAH	2 (1,0)
• Diabetes	1 (0,50)
• Doença celíaca	1 (0,50)
• Gastrite	1 (0,50)
• Glaucoma	1 (0,50)
Varicocele, n (%)	
• Não	177 (92,2)
• Sim	15 (7,8)
Cirurgia pélvica, n (%)	
• Não	159 (82,8)
• Sim	33 (17,2)
Atividade física, n (%)	
• Não pratica atividade física	56 (29,2)
• 1 a 2 vezes por semana	42 (21,9)
• 3 a 4 vezes por semana	47 (24,5)
• 5 a 6 vezes por semana	40 (20,8)
• 7 vezes por semana	7 (3,6)
Prática de ciclismo, n (%)	
• Não	158 (82,3)
• Sim	34 (17,7)
COVID-19, n (%)	
• Não	98 (51,0)
• Sim	94 (49,0)
Sintomas graves por COVID-19, n (%)	
• Não	89 (46,4)
• Sim	5 (2,6)
Tempo entre infecção e coleta por COVID-19, meses (DP)	
• 0 a 6 meses após infecção, n (%)	34 (36,2)
• > 6 meses após infecção, n (%)	60 (63,8)
Frustração devido a infertilidade, n (%)	
• Não	182 (94,8)
• Sim	10 (5,2)
Infertilidade na família, n (%)	
• Não	172 (89,6)
• Sim	20 (10,4)
Escala de estresse percebido, média (DP)	19,0 (7,0)
Escala de eventos de vida estressantes, média (DP)	1,14 (1,19)

Fonte: Elaborado pela autora.

Legenda: DP = desvio padrão; IMC = índice de massa corpórea; TDAH = transtorno de déficit de atenção com hiperatividade; COVID-19 = doença infecciosa causada pelo vírus SARS-CoV-2; kg/m² = Quilograma por metro quadrado; IST = Infecção Sexualmente Transmissível

A distribuição de médias para os parâmetros seminais entre as características dos participantes do estudo está detalhada na tabela 6. Participantes que relataram ter feito cirurgia pélvica apresentaram valores menores de espermatozoides morfologicamente normais quando comparados com participantes sem cirurgia pélvica (11,8% vs 14,6%, respectivamente; $p = 0,022$). Participantes que declararam ter depressão apresentaram motilidade progressiva inferior a participantes sem depressão (18,9% vs 21,9%, respectivamente; $p = 0,025$). Uso de celular por mais de 5 horas diárias em comparação com frequência inferior a 5 horas foi relacionado com redução em volume (2,91 ml vs 3,31 ml, respectivamente; $p = 0,021$) e contagem total de espermatozoides ($154,0 \times 10^6$ vs $206,9 \times 10^6$, respectivamente; $p = 0,035$).

Demais características como idade, IMC, estado civil, escolaridade, consumo de tabaco, frequência de consumo de álcool, IST no último ano, doenças crônicas, atividade física, prática de ciclismo, celular no bolso, infecção por COVID-19, tempo de infecção por COVID-19, frustração devido a infertilidade e infertilidade na família não demonstraram ter relação com os parâmetros do sêmen.

Os parâmetros de sêmen foram divididos entre acima e abaixo dos limites de referência estabelecidos pela OMS, no qual parâmetros com resultados abaixo dos limites foram considerados alterados. Participantes que relataram sintomas graves relacionados a infecção por COVID-19 tiveram 11,1 vezes mais chance de apresentar resultado de morfologia normal abaixo do limite de 4% do que participantes assintomáticos ou com sintomas leves (IC 95% = 1,49 a 82,1; $p = 0,044$). Participantes que relataram ter varicocele demonstraram 5,4 vezes mais chance de apresentarem vitalidade inferior a 54% do que participantes que não relataram varicocele (IC 95% = 1,47 a 19,7; $p = 0,021$).

Tabela 6 – Distribuição de médias dos parâmetros seminais entre características da população do estudo (continua)

Características	Parâmetros seminais								
	n (%)	Volume (ml)	Vitalidade (%)	Concentração (10 ⁶ /ml)	Contagem total (10 ⁶)	Motilidade		Morfologia normal (%)	Dano à integridade da cromatina (%)
						Progressiva (a+b) (%)	Total (a+b+c) (%)		
Idade (anos)									
< 25	96 (50,0)	3,32 (1,52)	67,9 (12,3)	193,3 (174,1)	22,8 (13,1)	47,5 (12,5)	59,2 (13,0)	14,2 (7,6)	21,9 (11,6)
≥ 25	96 (50,0)	2,96 (1,44)	65,0 (15,4)	176,5 (144,5)	20,4 (13,5)	47,2 (13,5)	58,3 (13,3)	14,0 (6,9)	24,3 (14,8)
<i>p</i> [*]	-	0,114	0,249	0,787	0,147	0,965	0,644	0,944	0,317
IMC (kg/m²)									
< 25	128 (66,7)	3,18 (1,50)	65,1 (15,6)	180,6 (161,4)	21,0 (13,1)	46,8 (13,5)	57,8 (13,7)	13,8 (7,3)	23,5 (13,5)
≥ 25	64 (33,3)	3,08 (1,48)	69,1 (9,31)	193,4 (151,3)	22,9 (13,7)	48,4 (12,0)	60,6 (11,7)	14,7 (7,1)	22,2 (13,1)
<i>p</i> [*]	-	0,673	0,125	0,409	0,387	0,442	0,225	0,459	0,491
Estado civil									
Solteiro	151 (78,6)	3,19 (1,46)	66,1 (13,6)	187,7 (165,1)	21,6 (13,4)	46,7 (12,8)	58,2 (12,9)	13,6 (6,9)	23,4 (13,6)
Casado	41 (21,4)	2,97 (1,62)	67,5 (15,5)	174,6 (139,9)	21,9 (13,1)	49,7 (13,4)	61,0 (13,8)	15,8 (8,2)	21,9 (12,2)
<i>p</i> [*]	-	0,244	0,266	0,820	0,871	0,105	0,138	0,087	0,574
Escolaridade									
Ensino superior completo	71 (37,0)	3,13 (1,45)	66,0 (15,4)	182,1 (165,5)	21,6 (13,4)	47,1 (12,9)	58,4 (13,5)	13,7 (7,5)	23,6 (12,6)
≤ Ensino superior incompleto	121 (63,0)	3,16 (1,56)	67,1 (11,2)	189,5 (150,6)	21,6 (13,2)	47,9 (13,2)	59,3 (12,5)	14,8 (6,7)	22,3 (14,5)
<i>p</i> [*]	-	0,999	0,965	0,381	0,991	0,606	0,691	0,175	0,410
Consumo de tabaco									
Não	166 (86,5)	3,22 (1,51)	67,1 (12,2)	186,4 (163,0)	21,4 (13,3)	47,6 (12,8)	59,1 (12,8)	14,0 (7,2)	23,1 (13,3)
Sim	26 (13,5)	2,64 (1,52)	62,0 (22,1)	175,0 (139,5)	22,9 (13,2)	45,5 (14,4)	56,7 (15,2)	14,9 (7,6)	23,2 (13,7)
<i>p</i> [*]	-	0,081	0,642	0,933	0,490	0,691	0,761	0,650	0,927

Tabela 6 – Distribuição de médias dos parâmetros seminais entre características da população do estudo (continua)

Características	n (%)	Parâmetros seminais							
		Volume (ml)	Vitalidade (%)	Concentração (10 ⁶ /ml)	Contagem total (10 ⁶)	Motilidade		Morfologia normal (%)	Dano à integridade da cromatina (%)
						Progressiva (a+b) (%)	Total (a+b+c) (%)		
Frequência de consumo de álcool									
Até 1 vez na semana	121 (63,0)	3,24 (1,52)	66,5 (13,8)	181,5 (158,8)	20,5 (13,4)	46,9 (13,0)	58,2 (13,4)	14,3 (6,8)	22,6 (13,6)
Duas vezes ou mais na semana	71 (37,0)	2,96 (1,43)	66,2 (14,3)	190,6 (67,6)	23,6 (13,0)	48,1 (12,9)	59,7 (12,6)	13,7 (7,9)	23,9 (13,0)
<i>p</i> *	-	0,308	0,885	0,710	0,086	0,458	0,414	0,392	0,546
IST no último ano									
Não	175 (91,1)	3,19 (1,53)	6,4 (14,1)	185,9 (160,4)	21,8 (13,4)	47,2 (13,0)	58,7 (13,2)	14,1 (7,2)	23,1 (13,2)
Sim	17 (8,9)	2,62 (0,87)	67,1 (12,5)	174,0 (157,9)	19,9 (12,5)	48,4 (13,2)	59,3 (12,4)	14,0 (7,9)	23,3 (14,5)
<i>p</i> *	-	0,176	0,984	0,626	0,501	0,672	0,768	0,696	0,954
Varicocele									
Não	177 (92,2)	3,11 (1,50)	66,6 (13,9)	185,0 (160,5)	21,8 (13,3)	47,8 (13,0)	59,1 (13,0)	14,0 (6,8)	23,3 (13,0)
Sim	15 (7,8)	3,45 (1,41)	63,7 (14,6)	183,0 (156,3)	19,3 (12,8)	42,7 (12,8)	54,5 (13,3)	15,1 (11,0)	20,5 (16,5)
<i>p</i> *	-	0,345	0,355	0,883	0,447	0,161	0,221	0,971	0,183
Cirurgia pélvica									
Não	159 (82,8)	3,07 (1,47)	66,6 (14,6)	190,1 (159,6)	22,4 (13,4)	48,0 (12,6)	59,4 (12,8)	14,6 (7,3)	22,9 (12,3)
Sim	33 (17,2)	0,48 (1,54)	65,5 (10,5)	159,6 (160,6)	17,8 (12,4)	44,1 (14,5)	55,7 (14,5)	11,8 (7,2)	24,0 (17,6)
<i>p</i> *	-	0,095	0,161	0,242	0,075	0,170	0,170	0,022	0,849
Doença crônica									
Não	151 (78,6)	3,14 (1,51)	66,5 (14,0)	184,0 (156,3)	21,3 (13,1)	47,3 (12,8)	58,6 (12,9)	14,2 (7,2)	23,3 (13,6)
Sim	41 (21,4)	3,15 (1,42)	66,2 (14,1)	188,0 (174,0)	23,0 (14,1)	47,5 (13,8)	59,4 (13,8)	13,6 (7,3)	22,4 (12,2)
<i>p</i> *	-	0,758	0,647	0,827	0,601	0,702	0,939	0,559	0,880

Tabela 6 – Distribuição de médias dos parâmetros seminais entre características da população do estudo (continua)

Características	n (%)	Parâmetros seminais							
		Volume (ml)	Vitalidade (%)	Concentração (10 ⁶ /ml)	Contagem total (10 ⁶)	Motilidade		Morfologia normal (%)	Dano à integridade da cromatina (%)
						Progressiva (a+b) (%)	Total (a+b+c) (%)		
Declaração de depressão									
Não	175 (91,1)	3,15 (1,51)	66,9 (13,5)	183,8 (154,2)	21,9 (13,6)	21,9 (13,6)	59,0 (13,3)	14,2 (7,0)	22,8 (13,3)
Sim	17 (8,9)	3,05 (1,33)	61,1 (17,6)	196,4 (214,6)	18,9 (9,9)	18,9 (9,7)	55,7 (10,4)	12,5 (9,4)	25,9 (14,1)
<i>p</i> *	-	0,980	0,077	0,745	0,479	0,025	0,112	0,245	0,333
Atividade física									
Até duas vezes na semana	98 (51,0)	3,23 (1,52)	66,9 (13,0)	176,8 (165,1)	21,3 (13,5)	47,0 (13,8)	58,4 (13,6)	13,3 (6,9)	24,1 (15,0)
3 ou mais vezes na semana	94 (49,0)	3,05 (0,46)	65,9 (14,9)	193,2 (154,4)	22,0 (13,2)	47,7 (12,1)	59,2 (12,6)	14,9 (7,5)	22,0 (11,3)
<i>p</i> *	-	0,463	0,831	0,221	0,786	0,938	0,847	0,082	0,513
Prática de ciclismo									
Não	158 (82,3)	3,13 (1,51)	66,1 (14,8)	183,6 (168,6)	20,7 (13,1)	46,7 (13,3)	58,3 (13,5)	14,2 (7,6)	23,3 (13,8)
Sim	34 (17,7)	3,19 (1,43)	67,7 (9,53)	190,6 (111,9)	25,8 (13,6)	50,3 (11,1)	60,9 (11,0)	13,8 (5,5)	22,2 (11,1)
<i>p</i> *	-	0,761	0,839	0,251	0,053	0,124	0,224	0,848	0,899
Uso de celular									
Até 5 horas por dia	112 (58,3)	3,31 (1,48)	65,9 (15,6)	206,9 (176,0)	21,8 (13,6)	47,4 (13,2)	58,9 (12,8)	14,2 (7,1)	22,3 (12,1)
> de 5 horas por dia	80 (41,7)	2,91 (1,48)	67,1 (11,4)	154,0 (128,7)	21,5 (13,0)	47,2 (12,8)	58,5 (13,6)	13,9 (7,5)	24,2 (14,9)
<i>p</i> *	-	0,021	0,992	0,035	0,910	0,992	0,976	0,556	0,500
Celular no bolso									
Não	32 (16,7)	2,81 (1,37)	60,5 (20,4)	143,3 (115,8)	20,4 (13,2)	45,7 (14,8)	56,4 (16,0)	15,3 (8,2)	26,7 (18,9)
Sim	160 (83,3)	3,21 (1,51)	67,6 (12,0)	193,2 (166,2)	21,9 (13,3)	47,7 (12,6)	59,2 (12,5)	13,0 (7,0)	22,4 (11,9)
<i>p</i> *	-	0,221	0,106	0,139	0,596	0,725	0,515	0,482	0,378

Tabela 6 – Distribuição de médias dos parâmetros seminais entre características da população do estudo (conclusão)

Características	n (%)	Parâmetros seminais							
		Volume (ml)	Vitalidade (%)	Concentração (10 ⁶ /ml)	Contagem total (10 ⁶)	Motilidade		Morfologia normal (%)	Dano à integridade da cromatina (%)
						Progressiva (a+b) (%)	Total (a+b+c) (%)		
COVID									
≤ 6 meses após infecção	34 (36,2)	3,32 (1,84)	68,62 (11,7)	199,5 (199,6)	24,2 (12,3)	50,5 (11,4)	63,1 (11,0)	15,9 (8,6)	18,4 (10,6)
> 6 meses após infecção	60 (63,8)	3,13 (1,35)	63,0 (21,5)	191,3 (153,4)	24,2 (14,6)	59,2 (14,2)	59,2 (14,1)	14,3 (7,1)	22,0 (12,1)
<i>p</i> *	-	0,617	0,277	0,738	0,863	0,589	0,357	0,621	0,162
Sintomas graves por COVID									
Não	89 (46,4)	3,19 (1,56)	66,5 (16,1)	185,6 (155,2)	24,2 (13,9)	48,7 (13,2)	60,1 (13,2)	15,1 (7,4)	20,6 (11,7)
Sim	5 (5,2)	3,26 (0,42)	69,0 (11,6)	299,2 (356,4)	21,6 (12,8)	50,8 (13,3)	63,6 (14,6)	10,6 (10,0)	27,3 (12,9)
<i>p</i> *	-	0,547	0,902	0,837	0,633	0,980	0,892	0,283	0,278
Frustração devido a infertilidade									
Não	182 (94,8)	3,17 (1,45)	66,9 (13,3)	187,6 (160,0)	22,0 (13,3)	47,4 (13,2)	58,8 (13,2)	14,3 (7,2)	22,9 (13,4)
Sim	10 (5,2)	3,69 (2,12)	58,1 (22,8)	134,9 (154,3)	14,9 (10,9)	45,4 (9,0)	58,1 (10,6)	9,8 (6,9)	26,6 (12,9)
<i>p</i> *	-	0,151	0,108	0,170	0,120	0,534	0,524	0,076	0,315
Infertilidade na família									
Não	172 (89,6)	3,16 (1,52)	66,3 (13,9)	186,2 (160,3)	22,0 (13,3)	47,5 (13,0)	59,0 (12,9)	14,3 (7,3)	22,9 (13,5)
Sim	20 (10,4)	3,01 (1,28)	67,3 (15,1)	173,5 (159,0)	18,3 (13,4)	46,5 (13,0)	56,7 (14,5)	12,7 (6,3)	25,0 (11,6)
<i>p</i> *	-	0,877	0,573	0,634	0,197	0,875	0,663	0,596	0,323

Fonte: elaborado pela autora.

Legenda: Valores apresentados como média ± desvio padrão. N = número de participantes; IMC = índice de massa corpórea; COVID-19 = doença infecciosa causada pelo vírus SARS-CoV-2; kg/m² = Quilograma por metro quadrado; IST = Infecção Sexualmente Transmissível.

As diferenças significativas entre os grupos foram determinadas com teste de U de Mann-Whitney, *p* < 0,05.

Análises de regressão linear foram realizadas para verificar associação entre parâmetros do sêmen e os questionários de estresse percebido (Tabela 7) e eventos de vida estressantes (Tabela 8). As análises de estresse não demonstraram ter relação com os parâmetros de sêmen no estudo.

Tabela 7 – Análises de regressão linear entre parâmetros do sêmen e estresse percebido

Parâmetro seminal	Não ajustado			Ajustado		
	Coefficiente	IC 95%	p	Coefficiente	IC 95%	p
Volume	- 0,003	- 0,011 a 0,006	0,558	- 0,001	- 0,017 a 0,014	0,880
Vitalidade	0,010	- 0,005 a 0,025	0,174	0,023	- 0,001 a 0,047	0,062
Concentração	- 0,001	- 0,072 a 0,070	0,978	0,063	- 0,050 a 0,177	0,270
Contagem total	- 0,031	- 0,148 a 0,087	0,608	0,059	- 0,154 a 0,271	0,585
Motilidade progressiva (a+b)	0,007	- 0,014 a 0,029	0,496	0,036	- 0,002 a 0,074	0,060
Motilidade total (a+b+c)	0,009	- 0,010 a 0,028	0,905	0,034	0,001 a 0,067	0,051
Morfologia normal	0,009	- 0,012 a 0,030	0,393	0,028	- 0,008 a 0,063	0,130
Dano à integridade da cromatina	- 0,003	- 0,030 a 0,025	0,859	- 0,029	- 0,076 a 0,017	0,208

Fonte: elaborado pela autora.

Legenda: Ajuste na regressão linear realizado para idade, índice de massa corpórea, consumo de tabaco, consumo de álcool, infecção sexualmente transmissível no último ano, varicocele, cirurgia pélvica, relato de depressão, frequência do uso de celular, e sintomas graves por COVID-19. $p < 0,05$.

Tabela 8 – Análises de regressão linear entre parâmetros do sêmen e eventos de vida estressantes

Parâmetro seminal	Não ajustado			Ajustado		
	Coefficiente	IC 95%	p	Coefficiente	IC 95%	p
Volume	0,004	- 0,047 a 0,054	0,881	0,125	- 0,173 a 0,423	0,407
Vitalidade	0,010	- 0,078 a 0,098	0,824	0,003	- 0,132 a 0,138	0,960
Concentração	- 0,055	- 0,470 a 0,360	0,794	0,259	- 0,359 a 0,877	0,408
Contagem total	- 0,124	- 0,816 a 0,568	0,724	0,488	- 0,663 a 1,638	0,401
Motilidade progressiva (a+b)	0,041	- 0,084 a 0,166	0,519	0,016	- 0,197 a 0,229	0,879
Motilidade total (a+b+c)	0,043	- 0,068 a 0,155	0,444	0,010	- 0,178 a 0,198	0,916
Morfologia normal	0,015	- 0,109 a 0,139	0,807	0,052	- 0,147 a 0,251	0,605
Dano à integridade da cromatina	- 0,082	- 0,242 a 0,079	0,319	- 0,209	- 0,457 a 0,039	0,097

Fonte: elaborado pela autora.

Legenda: Ajuste na regressão linear realizado para idade, índice de massa corpórea, consumo de tabaco, consumo de álcool, infecção sexualmente transmissível no último ano, varicocele, cirurgia pélvica, relato de depressão, frequência do uso de celular, e sintomas graves por COVID-19. $p < 0,05$.

4 DISCUSSÃO

Globalmente, a taxa de frequência de infertilidade masculina aumentou em 8,22% de 710,19 por 100 mil habitantes em 1990 para 768,59 por 100 mil habitantes em 2017, com taxa crescente de 0,291% ao ano. Além disso, as maiores estimativas de infertilidade masculina foram observadas em países com índice sociodemográfico mais baixos, pois embora não seja possível tratar todos os casos, o tratamento adequado leva a diminuição das taxas de infertilidade em regiões economicamente desenvolvidas (SUN et al., 2019). O ponto de partida da investigação de infertilidade masculina é a análise do sêmen. Apesar do espermograma não medir por completo o potencial de fertilização dos espermatozoides, parâmetros como a concentração de espermatozoides e a morfologia normal mostraram estar associados inversamente ao tempo até a gravidez natural. Testes adicionais para investigar a qualidade dos espermatozoides também podem contribuir para melhorar o diagnóstico e o manejo dos pacientes (WANG; SWERDLOFF, 2014). Ademais, muitas condições de saúde podem afetar a fertilidade masculina (AGARWAL et al., 2021), o que ressalta a necessidade de uma avaliação completa para identificar fatores de estilo de vida ou condições médicas tratáveis ou reversíveis que podem afetar a qualidade dos espermatozoides

Em nosso estudo, foi investigada a qualidade do sêmen de alunos e colaboradores da Universidade Federal de Santa Catarina. Ao todo, 210 participantes aceitaram participar da pesquisa e desses, 27,1% apresentaram ao menos um parâmetro seminal abaixo dos limites estabelecidos pela OMS. Porém, 15 participantes foram excluídos por apresentar condições clínicas (criptorquidia, hipospádia e hipotireoidismo) ou uso de medicamentos (reposição de testosterona e uso de finasterida) que sabidamente influenciam negativamente os parâmetros do sêmen (AGARWAL et al., 2021; CROSNOE et al., 2013; NIKOOBAKHT et al., 2012; SAMPLASKI et al., 2013) e 3 foram excluídos por não responder o questionário. Dessa forma, a frequência de alteração nos parâmetros do sêmen sem explicação aparente em 192 participantes foi de 21,9%, com oligozoospermia sendo a alteração mais comum com frequência de 15,1%. A frequência de alteração nos parâmetros seminais de um estudo em homens pré-vasectomizados foi de 12,8% (PASQUALOTTO et al., 2006), em homens diagnosticados com câncer antes de

iniciar quimioterapia foi de 15,0% (JAYASENA et al., 2018) e de militares em exercício foi de 62,5% (ZOU et al., 2011).

Em uma metanálise avaliando a concentração de espermatozoides de homens não selecionados quanto ao status de fertilidade, verificou-se que homens ocidentais (América do Norte, Europa, Austrália e Nova Zelândia) possuíam média de concentração de $49,1 \times 10^6/\text{ml}$, enquanto homens de outras regiões (América do Sul, Ásia e África) obtiveram concentração média de $61,2 \times 10^6/\text{ml}$ (LEVINE et al., 2022). A média de concentração de espermatozoides encontrada em nosso estudo foi de $64,7 \times 10^6/\text{ml}$, uma média semelhante ao de homens de regiões não ocidentais. Estudos brasileiros demonstraram uma redução de 44,1% a 56,7% da concentração de espermatozoides nas últimas duas décadas no país (BACCARO et al., 2017; BORGES et al., 2015). Baccaro e colaboradores (2017) verificaram que a concentração média de espermatozoides em 2010 era de $48,3 \times 10^6/\text{ml}$, enquanto Borges e colaboradores (2015) encontraram concentração média de $26,7 \times 10^6/\text{ml}$ no mesmo ano. Diferentemente do nosso estudo, essas investigações aconteceram em clínicas de fertilização, o que pode influenciar na redução da média, uma vez que baixa concentração de espermatozoide é um fator comum na infertilidade masculina (KUMAR; SINGH, 2015).

A avaliação da morfologia sob microscopia óptica mostra que as modificações morfológicas durante a espermiogênese são pouco homogêneas em humanos, gerando espermatozoides com morfologias variadas (GATIMEL et al., 2017). Observações de espermatozoides que migram através do muco do canal endocervical superior ajudaram a definir um espermatozoide de formato normal (MENKVELD et al., 1990). De acordo com o critério estrito de análise, apenas uma pequena porcentagem dos espermatozoides possui morfologia normal. O limite de referência atual é de 4% (WHO, 2021). Já a motilidade progressiva influencia diretamente nas taxas de fertilidade durante a concepção natural e assistida (DCUNHA et al., 2022; SIMON; LEWIS, 2011). Verificamos média para motilidade progressiva e morfologia normal de 47,4% e 14,1%, respectivamente. Comparativamente, um estudo brasileiro realizado em 2006 de homens pré-vasectomizados observou motilidade progressiva de 58,7% e morfologia normal de 17,6% (PASQUALOTTO et al., 2006).

Além das análises normalmente incluídas no espermograma, nosso estudo também investigou o dano à integridade da cromatina por meio da análise de

intensidade de coloração nuclear com azul de toluidina. Esse exame foi realizado porque a análise de rotina do sêmen é incapaz de estimar os dados na cromatina do espermatozoide. A integridade do DNA espermático influencia a capacidade funcional, portanto, testes que medem a fragmentação do DNA são importantes para avaliar os distúrbios da fertilidade (HAMILTON; ASSUMPÇÃO, 2020). Evidências apontam uma associação entre alta fragmentação do DNA espermático e resultados ruins no que diz respeito à concepção natural, inseminação intrauterina e também à abortos recorrentes (AGARWAL; CHO; ESTEVES, 2016; MCQUEEN; ZHANG; ROBINS, 2019; SANTI; SPAGGIARI; SIMONI, 2018). Falhas no processo de protaminação, apoptose e ação de espécies reativas de oxigênio (EROs) são consideradas as causas mais importantes de fragmentação do DNA (GOSÁLVEZ BERENQUER et al., 2008). A sexta edição do manual da OMS recomenda e detalha como testes de fragmentação de DNA como o TUNEL, SCSA, SCD e cometa devem ser realizados (WHO, 2021). Esses métodos, no entanto, exigem o uso de equipamentos e insumos caros e muitas vezes inacessíveis para a maioria dos laboratórios de andrologia (POURMASUMI et al., 2019).

O azul de toluidina é um corante nuclear básico usado para coloração metacromática da cromatina (ERENPREISA et al., 2003). Um estudo comparativo verificou que a proporção de células espermáticas com integridade de DNA anormal analisadas pelo teste de azul de toluidina demonstraram forte correlação com a proporção de células anormais detectadas pelos ensaios de SCSA e TUNEL (ERENPREISS et al., 2004). Além disso, dano à integridade da cromatina com azul de toluidina foi altamente preditivo para infertilidade (TSAREV et al., 2009). Dessa forma, o teste de azul de toluidina é uma alternativa mais barata aos métodos tradicionais e tem potencial para se tornar um teste de rotina para avaliação da integridade do DNA espermático. Em nosso estudo, a média de dano à integridade da cromatina determinada pelo método de azul de toluidina foi de 23,1%, variando de 2,0% a 96,0%. O dano à integridade da cromatina apresentou correlação negativa significativa com os parâmetros de vitalidade, motilidade progressiva, motilidade total e morfologia normal, ou seja, os valores para esses parâmetros diminuíram à medida que o dano de cromatina aumentou. Não observamos correlação entre dano à integridade da cromatina e os parâmetros de volume, concentração ou contagem total de espermatozoides. Divergindo de nossos resultados, Kim e colaboradores (2013) não observaram correlação entre dano à

cromatina e morfologia com azul de toluidina (KIM et al., 2013). Já Erenpreiss e colaboradores (2004) observaram correlação negativa com os parâmetros de concentração, motilidade e morfologia normal (ERENPREISS et al., 2004).

Para investigar se hábitos de vida tem influência sobre os parâmetros do espermograma, bem como sobre o dano à cromatina espermática, realizamos uma investigação em alunos e colaboradores da Universidade Federal de Santa Catarina. Apesar de boa parte dos participantes terem nascido em Santa Catarina (47,9%), homens originários de outras regiões do Brasil (47,9%), bem como provenientes de outros países (4,2%) que estavam, em sua maioria, estudando na universidade no momento da pesquisa, aceitaram participar do estudo.

As características e hábitos de vida que influenciaram os parâmetros do sêmen em nosso estudo foram relato de cirurgia pélvica, relato de depressão, uso de telefone celular por mais de 5 horas diárias, sintomas graves durante a infecção por COVID-19 e varicocele. Demais características como idade, IMC, estado civil, escolaridade, consumo de tabaco, frequência de consumo de álcool, IST no último ano, doenças crônicas, atividade física, prática de ciclismo, celular no bolso, infecção recente por COVID-19, frustração devido a infertilidade, infertilidade na família, estresse percebido e eventos de vida estressantes não demonstraram ter relação com os parâmetros do sêmen.

Cirurgia pélvica se mostrou associada a diminuição de espermatozoides morfologicamente normais no nosso estudo. Um estudo verificou que de 32 homens que realizaram cirurgia de reparo de lesão posterior da uretra devido a faturas pélvicas, três apresentaram alteração em volume, motilidade e concentração, porém morfologia não foi avaliada (ANGER; SHERMAN; WEBSTER, 2008). Cirurgia de correção de varicocele demonstrou melhorar a concentração, contagem total e motilidade progressiva, bem como reduzir os índices de fragmentação de DNA (SMIT et al., 2010). Nós não avaliamos o tipo de cirurgia que os participantes realizaram, porém, produção em excesso de EROs devido ao procedimento cirúrgico, resultando em detrimento morfológico, pode ser uma possível explicação para essa associação (ROSENFELDT et al., 2013). Estudos futuros estratificando os participantes por tipos de cirurgia, bem como tempo entre o procedimento e o exame do sêmen, podem ser úteis para avaliar de maneira mais adequada essa relação.

Participantes que relataram ter depressão apresentaram redução de motilidade progressiva quando comparados a participantes sem depressão. A

associação entre depressão e parâmetros espermáticos é conflitante. Enquanto alguns estudos demonstraram prejuízo para a concentração espermática (WDOWIAK et al., 2017; ZOU et al., 2018) e motilidade progressiva e total (YE et al., 2022), outros estudos não viram associação entre qualidade seminal e depressão (COWARD et al., 2019; HJOLLUND et al., 2004). Além disso, evidências sugerem que o uso de medicamentos antidepressivos podem também impactar negativamente a qualidade do sêmen (BEEDER; SAMPLASKI, 2020).

Dada a importância da relação entre estresse e saúde, é razoável suspeitar que o estresse poderia estar ligado à infertilidade (GREIL, 1997). O próprio tratamento de fertilização *in vitro* pode evocar ansiedade e os sintomas depressivos são considerados uma resposta normal a uma crise na vida de um casal infértil (BABORE et al., 2017; CHIAFFARINO et al., 2011). Estudos avaliando o papel do estresse na qualidade do sêmen humano em homens férteis e em homens em tratamento para infertilidade foram realizados ao longo das últimas décadas. Alguns trabalhos mostraram que o estresse psicológico foi associado à diminuição de volume, concentração, contagem total, morfologia normal e motilidade progressiva (ESKIOCAK et al., 2005a, 2005b; JUREWICZ et al., 2014; NORDKAP et al., 2016; VELLANI et al., 2013), bem como uma maior probabilidade de classificação abaixo dos limites da OMS para os parâmetros de concentração, motilidade e morfologia (GOLLENBERG et al., 2010). Por outro lado, nenhuma associação foi encontrada em outros estudos entre percepção de estresse (BHADORIA et al., 2020; LUND et al., 2023) ou eventos de vida estressante (BRÄUNER et al., 2020; FENSTER et al., 1997) e qualidade do sêmen.

Um fator que poderia ter contribuído para essa discrepância de resultados é o método aplicado para medir o estresse individual. Enquanto alguns estudos aplicaram a escala de estresse percebido (BHADORIA et al., 2020; JUREWICZ et al., 2014; LUND et al., 2023; NORDKAP et al., 2016), outros aplicaram o inventário de ansiedade traço-estado (ESKIOCAK et al., 2005a, 2005b; VELLANI et al., 2013) ou a escala de eventos de vida estressantes (BRAUNER et al., 2020; FENSTER et al., 1997; GOLLENBERG et al., 2010). Um estudo recente comparando a escala de estresse percebido com a escala de eventos de vida estressantes em 1362 homens que estavam se alistando ao serviço militar demonstrou que a percepção de estresse, mas não eventos estressantes em si, estava associada ao prejuízo da função testicular, com redução de concentração de espermatozoides, contagem total

e motilidade (NORDKAP et al., 2020). Em nosso estudo, escolhemos também aplicar a escala de estresse percebido e a escala de eventos de vida estressantes. Apesar de relato de depressão ter sido associada a redução de motilidade progressiva, não observamos associação entre qualidade do sêmen e percepção de estresse ou número de eventos de vida estressantes.

Uma das principais explicações biológicas apontadas para o estresse psicológico levar a redução da qualidade do sêmen refere-se às variações da secreção de testosterona em resposta ao estresse. O núcleo paraventricular no hipotálamo regula as respostas ao estresse e ativa o sistema simpático-adrenal e os eixos hipotálamo-hipófise-gonadal (HHG) e hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA). A ativação dos eixos HHG e HHA leva a uma queda nos níveis de testosterona nos testículos, afetando as células de Sertoli e a barreira hematotesticular (NARGUND, 2015). Outra hipótese é de que o efeito do estresse é direto sobre a concentração de testosterona sérica e que o efeito sobre o hipotálamo e a hipófise seja secundário a baixa concentração de testosterona sérica. Dessa forma, a concentração de testosterona diminui à medida que o nível de estresse psicológico do indivíduo aumenta, levando a um aumento secundário nas concentrações de LH e FSH (BHONGADE et al., 2015).

Receptores de glicocorticoides estão presentes em células de Leydig, Sertoli e células germinativas. Acredita-se que concentrações permanentemente elevadas de glicocorticoides induzam a apoptose nessas células (HAZRA et al., 2014; MAEDA et al., 2015; YAZAWA; SASAGAWA; NAKADA, 2000). Um estudo verificou que o polimorfismo Bcl1 do gene que codifica o receptor de glicocorticoides subfamília 3, grupo C, membro 1 (NR3C1) está associada com a qualidade do sêmen de uma maneira dominante com heterozigotos mostrando melhores parâmetros seminais quando comparados com homozigotos. Já os polimorfismos de nucleotídeo único 9 β e Tth1111 não foram associados aos parâmetros seminais (NORDKAP et al., 2017). Esses polimorfismos do receptor de glicocorticoide poderiam sugerir uma variabilidade da resposta individual ao estresse.

O estresse psicológico como fator primário e independente na infertilidade masculina é difícil de ser isolado, pois fatores confundidores como obesidade, consumo de álcool e o uso de tabaco estão comumente associados a indivíduos deprimidos e ansiosos (AL-ASADI; KLEIN; MEYER, 2015; REGIER et al., 1990). Esses fatores já foram associados a diminuição da qualidade dos parâmetros

seminais em alguns estudos (BENATTA et al., 2020; KOVAC; KHANNA; LIPSHULTZ, 2015; RICCI et al., 2017), mas não em outros (BHADORIA et al., 2020; KESKIN et al., 2016). Também não observamos qualquer associação entre esses fatores e a qualidade do sêmen em nosso estudo.

Outro fator que também pode estar ligado ao prejuízo da saúde mental, bem como à função testicular, é a dependência à telefones celulares (DEEPINDER; MAKKER; AGARWAL, 2007; THOMÉE, 2018). Em nossa pesquisa, o uso de smartphones por mais de 5 horas diárias foi associado com redução de volume e contagem total de espermatozoides. Estudos prévios verificaram que usar o telefone celular para ligações de mais de 1 hora foi prejudicial para a concentração espermática (ZILBERLICHT et al., 2015) e por mais de 4 horas foi associada a redução de concentração, contagem total, motilidade e morfologia normal (AGARWAL et al., 2008). Além do uso para conversa, usar o smartphone para acessos a internet foi associado à redução na concentração e motilidade total de espermatozoides em 2013 e redução no volume seminal em 2015 (ZHANG et al., 2016). Zilberlicht e colaboradores (2015) sugeriram que carregar o celular próximo da região escrotal também poderia ser prejudicial aos parâmetros seminais (ZILBERLICHT et al., 2015). Não observamos essa associação em nosso estudo. Hatch e colaboradores (2021) verificaram pouca associação entre carregar o celular no bolso e parâmetros de sêmen ou fecundidade (HATCH et al., 2021).

O principal mecanismo pelo qual os telefones celulares poderiam prejudicar a qualidade do sêmen é por meio da radiação eletromagnética emitida por esses aparelhos. O sistema reprodutor masculino é sensível a fatores externos como temperatura e estresse oxidativo (AGARWAL et al., 2018). A emissão de ondas eletromagnéticas de radiofrequência entre 700 e 2700 MHz emitida por telefones celulares pode ser absorvida pelo corpo e tem potencial efeitos adversos na morfologia e função dos órgãos reprodutivos e produção hormonal (KIM et al., 2021; SINGH et al., 2018; WDOWIAK et al., 2020). Portanto, pequenas doses de radioatividade também poderiam ser responsáveis por alterar as funções reprodutivas masculinas.

Também verificamos em nosso estudo que participantes que relataram ter varicocele demonstraram 5,4 vezes mais chances de apresentarem vitalidade abaixo do limite de referência de 54% estabelecido pela OMS e que participantes que relataram sintomas graves ou hospitalização devido à infecção por COVID-19

tiveram 11,1 vezes mais chances de apresentar resultado de morfologia normal abaixo do limite de 4%. A varicocele é uma anomalia anatômica urogenital que causa a dilatação de veias testiculares e é reconhecida como uma das principais causas de infertilidade masculina, sendo encontrada em cerca 15% de todos os homens e em 19% a 41% dos homens que apresentam infertilidade primária (PASTUSZAK; WANG, 2015). A varicocele aumenta a temperatura escrotal e reduz a perfusão testicular, o que leva ao prejuízo de parâmetros espermáticos (GILL et al., 2021). Já os efeitos da infecção por COVID-19 sobre o sistema reprodutor masculino são menos elucidados.

Infecção moderada a grave por COVID-19 parece prejudicar os parâmetros espermáticos (HOLTMANN et al., 2020). Pacientes diagnosticados com COVID-19 demonstraram concentração espermática significativamente inferior a controles (indivíduos não infectados), porém não houve associação com motilidade ou morfologia (AKSAK et al., 2022). Já pacientes recuperados de hospitalização por COVID-19 demonstraram deterioração dos parâmetros seminais quando comparados com controles. Esse mesmo grupo de pacientes que receberam alta realizaram nova coleta cerca de um mês depois. Foi observada melhora dos parâmetros de contagem total, concentração, motilidade e morfologia normal (GUO et al., 2021). Portanto, é improvável que infecção leve por COVID-19 afete a função testicular a longo prazo, já que o RNA de SARS-CoV-2 não é detectado após cerca de um mês em homens recuperados ou com doença aguda (PAN et al., 2020; VAHIDI et al., 2022; XIE et al., 2022). Dessa forma, a infecção por COVID-19 parece apresentar consequência adversa, porém reversível na função testicular.

Em nosso estudo, não observamos associação entre deterioração dos parâmetros seminais e infecção por COVID-19. Estratificamos também os participantes infectados por COVID-19 por tempo de infecção. Participantes infectados até seis meses antes da coleta não mostraram diferença de participantes que haviam sido infectados a mais tempo. De fato, a única associação que encontramos foi maior chance de participantes que relataram sintomas graves ou hospitalização por COVID-19 apresentarem resultado de morfologia normal inferior ao limite de 4%. Comparativamente, homens férteis com COVID-19 foram divididos em grupos de fase aguda e de fase de recuperação clínica em um estudo realizado no Irã. Análise do sêmen não revelou diferença significativa na concentração, contagem total ou motilidade espermática, porém os parâmetros de morfologia

normal e vitalidade estavam significativamente diminuídos em homens com a doença aguda (VAHIDI et al., 2022). Estudos atuais são insuficientes para estimar os danos a longo prazo na fertilidade de paciente gravemente afetados pela COVID-19. Esses indivíduos devem ficar atentos para sinais de possível infertilidade associada a infecção por COVID-19 no futuro quando desejarem planejar uma família.

Nosso estudo apresentou algumas limitações. Observamos frequência superior de espermogramas alterados em comparação com outros estudos em populações não selecionadas por status de fertilidade. Isso pode ser atribuído a um possível viés de seleção, uma vez que a participação no estudo foi voluntária e indivíduos poderiam se interessar na pesquisa para acompanhar alguma condição prévia relacionada a infertilidade. De fato, 5,2% dos participantes relataram frustração devido à infertilidade, o que pode ter contribuído com a superestimação de resultados alterados. Além disso, realizamos um estudo observacional sobre a relação entre hábitos de vida e sua influência sobre parâmetros espermáticos, no entanto, não estudamos os mecanismos pelos quais essas alterações acontecem e estudos de coorte serão necessários para avaliar essa relação.

5 CONCLUSÃO

A frequência de alteração nos parâmetros do sêmen sem explicação aparente foi de 21,9%, com oligozoospermia sendo a alteração mais comum com frequência de 15,1%. O dano à integridade da cromatina apresentou correlação negativa significativa com os parâmetros de vitalidade, motilidade progressiva, e morfologia normal, mas não com os parâmetros de volume, concentração ou contagem total de espermatozoides. A análise de hábitos de vida e qualidade do sêmen demonstrou que relato de cirurgia pélvica, depressão e uso de telefone celular por mais de 5 horas foi associado a redução de volume e contagem total de espermatozoides. Participantes que relataram varicocele tiveram 5,4 vezes mais chance de serem classificados abaixo do limite de referência para vitalidade de 54% e participantes que relataram sintomas graves ou hospitalização por COVID-19 tiveram 11,1 mais chance de serem classificados abaixo do limite de referência de morfologia de 4% estabelecido pela OMS. Estresse percebido e eventos de vida estressantes não demonstraram ter relação com os parâmetros do sêmen.

**CAPÍTULO 2. ANÁLISE DE SÊMEN
APÓS TRÊS HORAS EM DIFERENTES
CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO**

1 INTRODUÇÃO

Embora o espermograma seja o passo inicial para a investigação de infertilidade masculina, a análise de rotina do sêmen é incapaz de estimar os dados na cromatina do espermatozoide (HAMILTON; ASSUMPÇÃO, 2020).

Evidências apontam associação entre fragmentação de DNA espermático e dificuldade em alcançar a gravidez (AGARWAL; CHO; ESTEVES, 2016; MCQUEEN; ZHANG; ROBINS, 2019; SANTI; SPAGGIARI; SIMONI, 2018). A análise de dano à integridade da cromatina com azul de toluidina demonstrou boa correlação com métodos tradicionais para análise de fragmentação de DNA, bem como foi preditivo para infertilidade (ERENPREISS et al., 2004; TSAREV et al., 2009).

As condições de armazenamento da amostra parecem influenciar os parâmetros espermáticos de motilidade e vitalidade (APPELL; EVANS, 1977; SCHULTE et al., 2008). Porém não é claro se o dano à integridade da cromatina tem influência sobre esses parâmetros após incubação da amostra em diferentes condições.

2 MÉTODOS

2.1 INFLUÊNCIA DO ARMAZENAMENTO POR TRÊS HORAS DO SÊMEN A 4°C E A 37°C SOBRE A CONCENTRAÇÃO, MOTILIDADE E VITALIDADE ESPERMÁTICA

Duas alíquotas da amostra bem homogeneizada foram separadas para armazenamento em estufa a 37°C e em geladeira a 4°C por três horas. Análises de concentração, motilidade e vitalidade na terceira hora foram realizadas por um observador diferente que não tinha conhecimento dos resultados obtidos na análise da primeira hora. O segundo observador foi previamente treinado antes de realizar as análises. Os valores obtidos para concentração, motilidade e vitalidade na análise de três horas foram comparados com os resultados obtidos logo após a liquefação da amostra.

2.2 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O teste de Kruskal-Wallis foi aplicado para verificar se as medidas de concentração, motilidade e vitalidade logo depois da liquefação e três horas depois apresentam distribuições iguais ou diferentes. As medianas para os parâmetros de dano à integridade da cromatina, defeito morfológico de cabeça, defeito morfológico de peça intermediária, defeito morfológico de cauda, excesso de citoplasma residual, número de células germinativas e número de leucócitos foram calculados e os valores foram divididos entre percentil 50 inferior e superior para verificar a distribuição das medidas de concentração, motilidade e vitalidade entre esses grupos. As análises estatísticas foram realizadas com o software SPSS® versão 22,0 (SPSS Inc., Chicago, Estados Unidos da América) e com o software GraphPad Prism® versão 9,5 (GraphPad Software, San Diego, Estados Unidos da América). O teste de Shapiro-Wilk foi utilizado para verificar a normalidade dos dados e as diferenças estatisticamente significativas foram definidas como $p < 0,05$.

3 RESULTADOS

Análises de concentração, motilidade e vitalidade foram realizadas em 46 amostras logo após a liquefação e três horas depois de serem armazenadas em geladeira a 4°C e em estufa a 37°C.

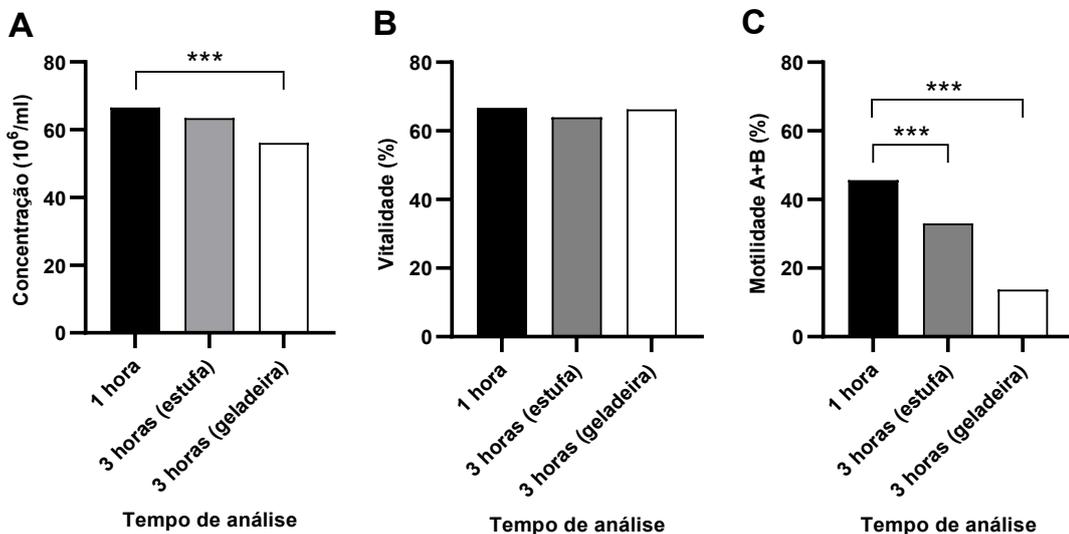
A média para concentração logo após a liquefação foi de $66,6 \pm 50,6 \times 10^6/\text{ml}$. Análise da amostra armazenada em estufa a 37°C resultou em concentração de $63,4 \pm 48,6 \times 10^6/\text{ml}$ e a amostra armazenada em geladeira a 4°C apresentou concentração de $56,0 \pm 45,9 \times 10^6/\text{ml}$. Diferença estatística foi observada entre a análise após liquefação e após armazenamento em geladeira a 4°C ($p < 0,0001$), mas não entre análise após liquefação e após armazenamento em estufa a 37°C ($p = 0,085$) (Figura 10A).

Análise de vitalidade logo após a liquefação apresentou média de $66,7 \pm 11,1\%$. Após armazenamento em estufa e geladeira, a média para o parâmetro de vitalidade foi de $63,9 \pm 14,0\%$ e $66,2 \pm 16,3\%$, respectivamente. Não houve diferença estatística entre as análises de primeira hora e após 3 horas na estufa ($p = 0,256$) ou de primeira hora e após 3 horas na geladeira ($p = 0,481$) (Figura 10B).

A média de motilidade progressiva logo após liquefação foi de $45,7 \pm 11,5\%$. Após armazenamento em estufa e geladeira por três horas, as médias para motilidade progressiva foram de $33,0 \pm 17,9\%$ e $13,7 \pm 16,1\%$, respectivamente. Análise após armazenamento por três horas em estufa e geladeira apresentaram redução significativa de motilidade progressiva para ambos os parâmetros quando comparados a análise logo após liquefação ($p < 0,0001$ para ambos) (Figura 10C).

As medianas para os parâmetros analisados logo após liquefação de dano à integridade da cromatina, defeito morfológico de cabeça, defeito de peça intermediária, defeito de cauda, excesso de citoplasma residual, número de células germinativas foram calculados e os valores foram divididos entre percentil 50 inferior e superior para verificar a distribuição das medidas de concentração, motilidade e vitalidade entre esses grupos. Para número de leucócitos o percentil 80 foi calculado, pois boa parte das amostras não tinham presença de leucócitos e a mediana calculada foi zero.

Figura 10 – Análise de amostras após a liquefação e três horas após armazenamento em estufa e geladeira



Fonte: Elaborado pela autora.

Legenda: Amostras de sêmen foram analisadas para (A) concentração, (B) vitalidade e (C) motilidade progressiva logo após a liquefação (1 hora) e após 3 horas de armazenamento em estufa a $37^{\circ}C$ e em geladeira a $4^{\circ}C$. As diferenças significativas entre os grupos foram determinadas com teste de Kruskal-Wallis. $p < 0,0001$ (***)

Maior dano à cromatina de espermatozoides foi associada a redução expressiva de concentração após armazenamento em estufa ($p = 0,028$), bem como após armazenamento em geladeira por três horas ($p < 0,0001$). Em amostras cujo

dano à cromatina era menor, a concentração se manteve estável após três horas em estufa ($p = 0,889$) e geladeira ($p = 0,065$). Amostras com maior proporção de defeitos de cabeça e defeitos de peça intermediária também apresentaram queda expressiva de concentração após armazenamento em estufa por três horas ($p = 0,026$ e $p = 0,043$, respectivamente) quando comparado as amostras com menor proporção desses defeitos ($p = 0,768$ e $p = 0,726$, respectivamente), porém esse efeito não foi observado em amostras armazenadas em geladeira, no qual a redução de concentração foi significativa tanto no percentil inferior como superior para os defeitos de cabeça e peça intermediária (Tabela 9).

O parâmetro de vitalidade se manteve estável após três horas de armazenamento tanto em estufa como em geladeira quando os parâmetros foram divididos em percentis inferiores e superiores ($p > 0,05$) (Tabela 10). Já o parâmetro de motilidade progressiva sofreu queda após armazenamento tanto em estufa como em geladeira em análise de percentil para todos os parâmetros analisados ($p < 0,05$) (Tabela 11).

Tabela 9 – Análise de concentração após liquefação e após três horas de armazenamento em estufa e geladeira por percentil inferior e superior de parâmetros do sêmen

Parâmetros	Concentração (10 ⁶ /ml)				
	1 hora	3 horas			
	Média (DP)	Estufa (37°C), média (DP)	<i>p</i> *	Geladeira (4°C), média (DP)	<i>p</i> *
Dano à integridade da cromatina					
< Percentil 50	52,2 (40,7)	51,2 (37,2)	0,889	46,8 (35,0)	0,065
> Percentil 50	76,8 (48,9)	71,2 (47,5)	0,028	60,5 (42,6)	< 0,0001
Defeito de cabeça					
< Percentil 50	71,1 (45,9)	68,5 (45,0)	0,768	61,6 (42,1)	0,027
> Percentil 50	62,8 (54,9)	59,1 (52,0)	0,026	51,4 (49,2)	< 0,0001
Defeito de peça intermediária					
< Percentil 50	64,4 (56,3)	62,4 (55,3)	0,726	57,1 (53,5)	0,032
> Percentil 50	68,7 (45,3)	64,4 (42,0)	0,043	54,9 (38,0)	< 0,0001
Defeito de cauda					
< Percentil 50	71,5 (54,7)	67,1 (48,8)	0,313	59,4 (44,6)	0,004
> Percentil 50	62,4 (47,7)	60,3 (49,2)	0,162	53,2 (47,6)	0,003
Excesso de citoplasma residual					
< Percentil 50	70,6 (51,5)	68,0 (50,3)	0,733	60,4 (48,4)	0,008
> Percentil 50	62,9 (50,6)	59,2 (47,7)	0,054	52,1 (44,1)	0,001
Células germinativas					
< Percentil 50	47,7 (36,6)	45,0 (33,2)	0,119	39,4 (28,4)	0,002
> Percentil 50	83,8 (56,0)	80,3 (54,7)	0,170	71,3 (53,6)	0,004
Leucócitos					
< Percentil 80	70,3 (49,6)	68,4 (49,5)	0,242	60,7 (47,5)	0,001
> Percentil 80	51,0 (54,6)	42,8 (40,7)	0,123	37,0 (34,4)	0,008

Fonte: Elaborado pela autora.

Legenda: Amostras de sêmen foram analisadas para concentração logo após a liquefação (1 hora) e após 3 horas de armazenamento em estufa a 37°C e em geladeira a 4°C. As diferenças significativas entre os grupos foram determinadas com teste de Kruskal-Wallis, $p < 0,05$ (*). DP = desvio padrão.

Tabela 10 – Análise de vitalidade após liquefação e após três horas de armazenamento em estufa e geladeira por percentil inferior e superior de parâmetros do sêmen

Parâmetros	Vitalidade (%)				
	1 hora	3 horas			
	Média (DP)	Estufa (37°C), média (DP)	<i>p</i> *	Geladeira (4°C), média (DP)	<i>p</i> *
Dano à integridade da cromatina					
< Percentil 50	68,8 (8,4)	65,9 (11,2)	0,289	69,4 (12,3)	0,972
> Percentil 50	66,6 (11,4)	60,9 (15,6)	0,198	62,4 (19,8)	0,935
Defeito de cabeça					
< Percentil 50	70,8 (8,5)	67,3 (13,5)	0,676	69,1 (20,1)	0,414
> Percentil 50	63,4 (12,1)	61,1 (14,1)	0,271	63,8 (12,2)	0,809
Defeito de peça intermediária					
< Percentil 50	67,1 (11,7)	65,1 (16,0)	0,845	67,3 (14,4)	0,403
> Percentil 50	66,4 (10,8)	62,8 (12,0)	0,136	65,2 (18,3)	0,820
Defeito de cauda					
< Percentil 50	72,1 (8,0)	65,8 (13,1)	0,097	68,0 (15,4)	0,566
> Percentil 50	62,2 (11,5)	62,3 (14,8)	0,989	64,7 (17,2)	0,166
Excesso de citoplasma residual					
< Percentil 50	66,0 (10,8)	66,0 (12,0)	0,639	69,3 (10,0)	0,299
> Percentil 50	67,4 (11,6)	62,1 (15,7)	0,241	63,5 (20,3)	0,954
Células germinativas					
< Percentil 50	65,1 (12,2)	62,6 (15,0)	0,135	67,2 (15,8)	0,277
> Percentil 50	68,3 (10,1)	65,1 (13,3)	0,808	65,3 (17,0)	0,989
Leucócitos					
< Percentil 80	68,4 (10,6)	62,0 (14,2)	0,530	67,2 (16,4)	0,497
> Percentil 80	64,9 (12,2)	65,8 (10,4)	0,882	62,2 (16,2)	0,813

Fonte: Elaborado pela autora.

Legenda: Amostras de sêmen foram analisadas para vitalidade logo após a liquefação (1 hora) e após 3 horas de armazenamento em estufa a 37°C e em geladeira a 4°C. As diferenças significativas entre os grupos foram determinadas com teste de Kruskal-Wallis, $p < 0,05$ (*). DP = desvio padrão.

Tabela 11 – Análise de motilidade progressiva após liquefação e após três horas de armazenamento em estufa e geladeira por percentil inferior e superior de parâmetros do sêmen

Parâmetros	Motilidade progressiva (%)				
	1 hora	3 horas			
	Média (DP)	Estufa (37°C), média (DP)	<i>p</i> *	Geladeira (4°C), média (DP)	<i>p</i> *
Dano à integridade da cromatina					
< Percentil 50	46,7 (11,8)	31,7 (18,0)	0,001	15,8 (17,5)	< 0,0001
> Percentil 50	45,7 (10,4)	32,7 (17,0)	0,001	11,4 (14,6)	< 0,0001
Defeito de cabeça					
< Percentil 50	50,2 (8,1)	33,8 (16,1)	< 0,0001	15,2 (17,0)	< 0,0001
> Percentil 50	41,9 (12,7)	32,4 (19,7)	0,003	12,4 (15,7)	< 0,0001
Defeito de peça intermediária					
< Percentil 50	45,9 (12,4)	32,7 (17,8)	0,001	16,4 (17,3)	< 0,0001
> Percentil 50	45,4 (10,7)	33,3 (18,4)	0,002	11,0 (14,7)	< 0,0001
Defeito de cauda					
< Percentil 50	49,8 (11,7)	33,6 (18,4)	< 0,0001	15,9 (18,0)	< 0,0001
> Percentil 50	42,2 (10,3)	32,5 (17,9)	0,007	11,8 (14,5)	< 0,0001
Excesso de citoplasma residual					
< Percentil 50	44,9 (12,2)	31,8 (17,1)	0,002	18,0 (17,4)	< 0,0001
> Percentil 50	46,4 (11,0)	34,1 (19,0)	0,001	9,7 (14,1)	< 0,0001
Células germinativas					
< Percentil 50	42,9 (12,2)	31,0 (19,8)	0,009	10,0 (14,6)	< 0,0001
> Percentil 50	48,3 (10,4)	34,8 (19,8)	< 0,0001	17,1 (17,0)	< 0,0001
Leucócitos					
< Percentil 80	46,6 (11,5)	31,0 (16,9)	< 0,0001	12,8 (15,3)	< 0,0001
> Percentil 80	42,0 (11,3)	35,0 (22,5)	0,02	17,4 (19,8)	0,017

Fonte: Elaborado pela autora.

Legenda: Amostras de sêmen foram analisadas para motilidade progressiva logo após a liquefação (1 hora) e após 3 horas de armazenamento em estufa a 37°C e em geladeira a 4°C. As diferenças significativas entre os grupos foram determinadas com teste de Kruskal-Wallis, $p < 0,05$ (*). DP = desvio padrão.

4 DISCUSSÃO

Em nosso estudo, avaliamos no estudo a influência de condições de armazenamento e do tempo de análise sobre a concentração, motilidade e vitalidade espermática. Armazenamento por três horas em estufa a 37°C foi responsável por redução da motilidade progressiva, mas não de concentração. Já armazenamento por três horas em geladeira a 4°C foi responsável por redução de concentração e motilidade progressiva. A proporção de espermatozoides vivos se manteve estável em ambas as condições.

Uma análise temporal de 3, 6, 12 e 18 horas após a coleta já havia verificado que motilidade tem redução expressiva após 6 horas quando armazenado nas temperaturas de 4°C e 37°C, porém a vitalidade é mantida estável somente na temperatura de 4°C por até 18 horas (APPELL; EVANS, 1977). Schulte e colaboradores (2008) realizaram um estudo para identificar pacientes com diminuição na motilidade espermática de 1 a 2 horas após a coleta e examinar relações preditivas com parâmetros espermáticos. Nesse estudo, 16% dos participantes demonstraram redução significativa de motilidade entre as horas 1 e 2. Desses, a concentração e a porcentagem de morfologia normal foram significativamente menores. Analisando os defeitos morfológicos, observou-se que defeitos de cabeça e de peça intermediária, mas não de cauda, foram relacionados à redução de motilidade entre 1 e 2 horas (SCHULTE et al., 2008). Em nosso estudo, observamos redução de motilidade após três horas tanto em estufa como em geladeira, no entanto, a redução de motilidade na geladeira foi muito mais expressiva.

Nós também investigamos os fatores associados com a redução dos parâmetros entre 1 e 3 horas de análise após armazenamento em estufa e geladeira. Nenhuma característica espermática se mostrou associada à motilidade ou vitalidade. Observamos que maior dano à cromatina espermática foi associada à redução de concentração e que em amostras cujo dano à cromatina era menor, a concentração se manteve estável após três horas tanto em estufa como em geladeira. A integridade da cromatina é crucial para a fertilização e desenvolvimento de descendentes saudáveis (AGARWAL et al., 2020). Além disso, alta fragmentação do DNA espermático está associada a dificuldade de concepção natural e *in vitro* (AGARWAL; CHO; ESTEVES, 2016; SANTI; SPAGGIARI; SIMONI, 2018).

Verificamos que o DNA espermático íntegro, bem como menor proporção de danos à cabeça e à peça intermediária, evitaram a queda de concentração após armazenamento por três horas em temperatura de 37°C. A fragmentação de DNA é uma característica da apoptose (YAN et al., 2006). Além disso, células positivas para TUNEL são eliminadas por células fagocitárias (MCILROY et al., 2000; NONAKA et al., 2017). Portanto, a queda de concentração em amostras com dano à cromatina poderia estar relacionada ao mecanismo de fagocitose leucocitária de células com DNA danificado. Propomos que a avaliação temporal de parâmetros espermáticos associada a análise de dano à integridade da cromatina com azul de toluidina possa ser uma alternativa simples e barata para avaliar a capacidade funcional de espermatozoides.

Uma limitação neste estudo da influência da temperatura e tempo de armazenamento do sêmen sobre os parâmetros espermáticos foi a realização das análises somente no ponto de três horas após a coleta. Apesar da análise ter sido suficiente para realizar inferências sobre a concentração, análise na segunda hora após liquefação poderia ter oferecido mais informações sobre a motilidade espermática. Escolhemos o ponto de três horas porque a análise em duas horas seria inviável logisticamente devido à necessidade de deslocamento entre o laboratório e o hospital para conversar com os participantes e ao tempo demandado para as análises após a coleta. Preferencialmente, esse experimento deverá ser repetido no futuro com condições ideais.

5 CONCLUSÃO

Armazenamento por três horas em estufa a 37°C foi responsável por redução da motilidade progressiva, mas não de concentração. Já armazenamento por três horas em geladeira a 4°C foi responsável por redução de concentração e motilidade progressiva. A proporção de espermatozoides vivos se manteve estável em ambas as condições. Maior dano à integridade da cromatina espermática foi associada a redução de concentração de espermatozoides, enquanto amostras com menor dano da cromatina apresentaram concentração estável após três horas tanto em estufa como em geladeira. A avaliação temporal de parâmetros espermáticos associada a análises de dano à integridade da cromatina com azul de toluidina pode

ser uma alternativa simples e barata para avaliar a capacidade funcional de espermatozoides.

CAPÍTULO 3. COMPARAÇÃO ENTRE
HEMOCITÔMETRO DE NEUBAUER E
CÂMARA DE MAKLER

1 INTRODUÇÃO

Existe uma variedade de métodos comercialmente disponíveis para avaliar a concentração de espermatozoides, mas a falta de garantia da qualidade e padronização pode levar a discrepâncias nos resultados e, conseqüentemente, a erros de diagnóstico e seleção equivocada da estratégia de tratamento (DARDMEH; HEIDARI; ALIPOUR, 2021; PENG; ZOU; LI, 2015).

A avaliação da concentração espermática com o hemocitômetro de Neubauer é o método recomendado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) e demais laboratórios de andrologia (KUSTER, 2005; WHO, 2021; ZUVELA; MATSON, 2020). A câmara de Makler foi introduzida como uma alternativa para facilitar a contagem de espermatozoides, pois a avaliação pode ser feita de maneira mais rápida e direta a partir da amostra não diluída (MAKLER, 1978).

Diversos laboratórios utilizam a câmara de Makler (ALVAREZ et al., 2005; WANG et al., 2022), incluindo o Brasil (BORGES et al., 2015; GLINA et al., 2010; PASQUALOTTO et al., 2006; SIQUEIRA et al., 2020). Resultados conflitantes na comparação entre essas duas câmaras foram observados entre estudos (BAILEY et al., 2007; CARDONA-MAYA; BERDUGO; CADAVID, 2008; IMADE et al., 1993). Dessa forma, é necessário garantir que os resultados obtidos por ambas as câmaras possam ser intercambiáveis antes de realizar quaisquer comparações com demais pesquisas.

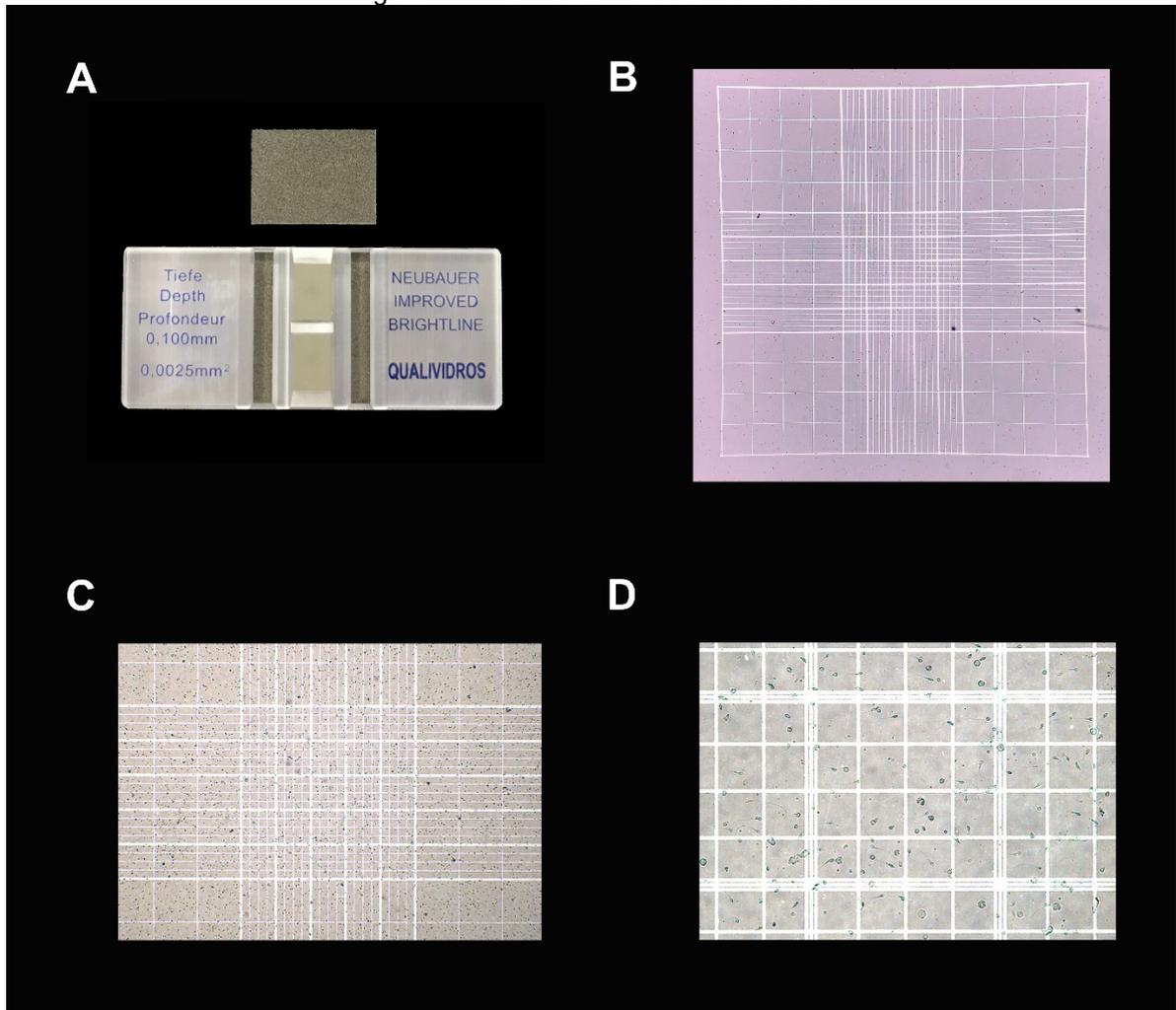
2 MÉTODOS

2.1.1 Determinação de concentração com o hemocitômetro de Neubauer

O hemocitômetro utilizado no estudo foi uma câmara de contagem de Neubauer espelhada (Qualividros, Minas Gerais, Brasil). O hemocitômetro de Neubauer é composto por uma lâmina de vidro espessa, sobre a qual existem plataformas de área conhecida e profundidade precisamente controlada. A grade de contagem possui 3 mm x 3 mm de comprimento com 9 subdivisões de 1 mm de largura e 0,1 mm de profundidade cada. O quadrado central do hemocitômetro cobre uma área de 1,0 mm² e é dividida em 25 quadrados menores com área de 0,2 mm² e

volume de $0,004 \text{ mm}^3$. Os quatro cantos do hemocitômetro cobrem uma área de $4,0 \text{ mm}^2$ e volume total de $0,4 \text{ mm}^3$ (Figura 11).

Figura 11 – Hemocitômetro de Neubauer



Fonte: Imagens elaboradas no Laboratório de Citologia Clínica da Universidade Federal de Santa Catarina (LACIT – UFSC) com materiais e amostras do estudo.

Legenda: (A) Hemocitômetro de Neubauer com lamínula; (B) Foto obtida em aumento de 40x de um dos lados do hemocitômetro de Neubauer; (C) Foto obtida em aumento de 100x; (D) Foto obtida em aumento de 200x.

Para a determinação de concentração, um exame microscópico inicial foi realizado para determinar a diluição necessária para avaliar pelo menos 200 espermatozoides (quadro 2). A diluição com fixador para imobilização dos espermatozoides foi preparada dissolvendo 50 g de bicarbonato de sódio (NaHCO_3) em cerca de 500 ml de água destilada, acrescentando-se 10 ml de solução de formaldeído 36 - 40% e completando o volume final para 1000 ml. Após a diluição adequada, os dois lados do hemocitômetro foram carregados até ficarem cheios, certificando-se de que não houve extravasamento da suspensão de

espermatozoides ou formação de bolhas. O hemocitômetro foi armazenado horizontalmente por 10 a 15 minutos em uma câmara úmida para permitir a completa sedimentação dos espermatozoides na câmara e evitar o ressecamento da amostra.

Quadro 2 – Determinação da diluição adequada com base no número de espermatozoides por campo

Espermatozoides por campo (x200)	Diluição adequada	Sêmen (µl)	Fixador (µl)
> 800	1:50 (1+49)	50	2450
160 a 800	1:20 (1 + 19)	50	950
64 a 160	1:10 (1 + 9)	50	450
8 a 64	1: 5 (1+ 5)	50	200
< 8	1:2 (1 + 1)	100	100

Fonte: adaptado de (WHO, 2021).

A concentração do espermatozoides no hemocitômetro de Neubauer foi estimada de acordo com os parâmetros estabelecidos pela OMS (WHO, 2021). Em amostras concentradas, a contagem foi feita somente no quadrado central do hemocitômetro. Nos casos de concentrações muito baixas em que não foi possível contar 200 espermatozoides no quadrado central, os espermatozoides foram contados também nas demais grades da câmara. Contagens foram realizadas em duplicata para cada amostra de sêmen e o valor médio foi contabilizado.

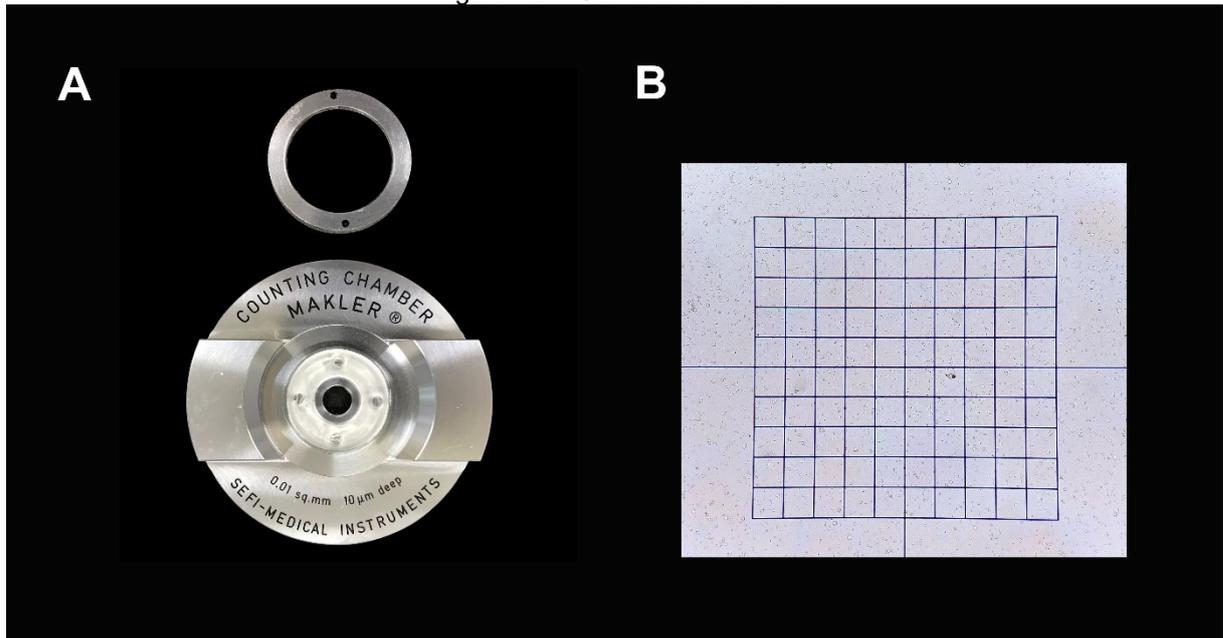
2.1.2 Determinação de concentração com a câmara de Makler

A câmara de Makler utilizada no estudo (Sefi Medical Instruments, Haifa, Israel) é formada por duas peças que quando unidas conferem à câmara profundidade de 0,01 mm. A lamínula possui uma grade de 1 mm² no centro que é subdividida em 100 quadrados menores com área de 0,01 mm² cada (figura 12).

A amostra de sêmen foi colocada em banho-maria a 60°C por 5 minutos para garantir a imobilidade dos espermatozoides antes da contagem. Uma alíquota 5µl da amostra aquecida foi transferida para a câmara de Makler e a lamínula foi imediatamente aplicada. Cuidado foi tomado para evitar a formação de bolhas. Uma avaliação microscópica inicial em ampliação de 100x foi realizada para garantir que a amostra estivesse espalhada uniformemente na câmara. Os espermatozoides

foram contados em ampliação de 200x. Em amostras concentradas, 10 quadrados foram analisados e o número de espermatozoides contados foi multiplicado por um milhão (10^6) para obter a concentração por ml. A grande inteira (100 quadrados) foi contada em casos de oligozoospermia e o número de espermatozoides contados foi multiplicado por 100 mil (10^5) para obter a concentração por ml (MAKLER, 1980).

Figura 12 – Câmara de Makler



Fonte: Imagens elaboradas no Laboratório de Citologia Clínica da Universidade Federal de Santa Catarina (LACIT – UFSC) com materiais e amostras do estudo.

Legenda: (A) Câmara de Makler com lamínula; (B) A lamínula da câmara de Makler possui uma grade de 1 mm^2 que é subdividida em 100 quadrados menores com área de $0,01 \text{ mm}^2$ e profundidade de $0,0001 \text{ mm}^3$ cada, foto obtida em aumento de 40x.

2.1.3 Determinação de concentração com esferas de látex

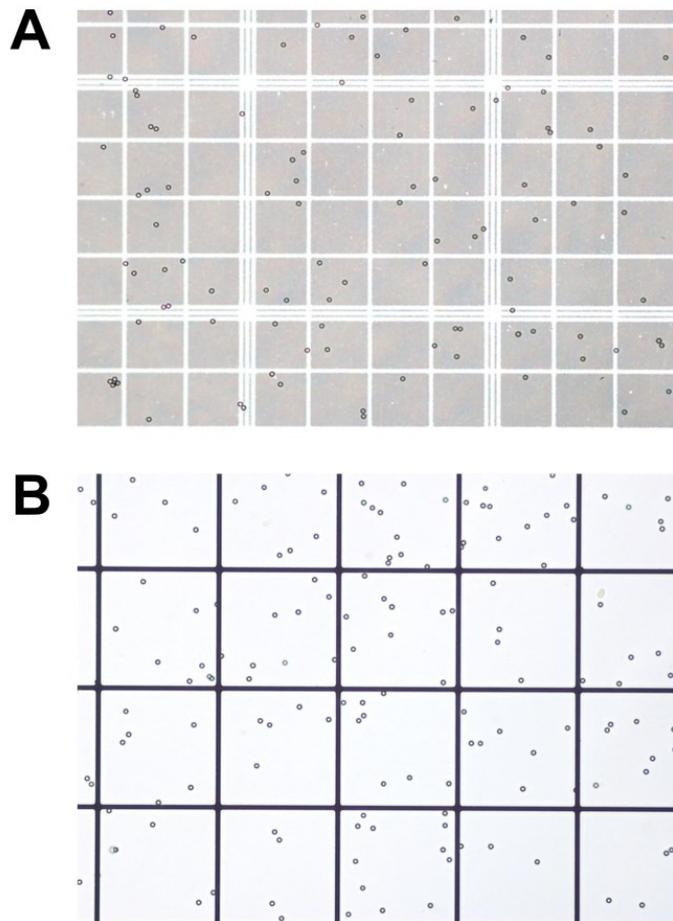
Duas suspensões padrão de esferas de látex de $4 \mu\text{m}$ com concentrações alvo determinadas pelo fabricante de $50,0 \pm 12,3 \times 10^6/\text{ml}$ e $25,0 \pm 6,5 \times 10^6/\text{ml}$ foram usadas como estoques de referência (QwikCheck Beads, Medical Electronic Systems, Los Angeles, Estados Unidos da América). Estoques adicionais foram preparados diluindo as suspensões de $50,0 \times 10^6/\text{ml}$ com tampão fosfato salino (PBS) para atingir concentrações finais de $15,0 \times 10^6/\text{ml}$ ($300 \mu\text{l}$ de esferas de látex + $700 \mu\text{l}$ de PBS), $10,0 \times 10^6/\text{ml}$ ($200 \mu\text{l}$ de esferas de látex + $800 \mu\text{l}$ de PBS) e $5,0 \times 10^6/\text{ml}$ ($100 \mu\text{l}$ de esferas de látex + $900 \mu\text{l}$ de PBS). Todas as suspensões foram contadas manualmente no hemocítômetro de Neubauer e na câmara de Makler

(Figura 13) cinco vezes. Uma semana depois, novas suspensões foram preparadas e contadas mais cinco vezes, totalizando dez contagens para cada método.

Para análise no hemocitômetro de Neubauer, as suspensões de esferas de látex de $5,0 \times 10^6/\text{ml}$, $10,0 \times 10^6/\text{ml}$ e $15,0 \times 10^6/\text{ml}$ foram diluídas com PBS adicionando $100\mu\text{l}$ de esferas de látex a $100\mu\text{l}$ de PBS (diluição de 1:2). A suspensão estoque de $25,0 \times 10^6/\text{ml}$ foi diluída adicionando $50\mu\text{l}$ de esferas de látex a $200\mu\text{l}$ de PBS (diluição de 1:5). Finalmente, a suspensão estoque de $50,0 \times 10^6/\text{ml}$ foi diluída adicionando $50\mu\text{l}$ de esferas de látex a $450\mu\text{l}$ de PBS (diluição de 1:10). Após a diluição, os dois lados do hemocitômetro foram preenchidos até ficarem cheios, certificando-se de que a câmara não estava cheia demais ou com preenchimento insuficiente. O hemocitômetro foi armazenado horizontalmente por 10 a 15 minutos em uma câmara úmida para permitir a sedimentação completa das esferas e evitar o ressecamento. A contagem foi realizada de acordo com os parâmetros estabelecidos pela OMS (WHO, 2021).

Para análise na câmara de Makler, alíquotas de $5\mu\text{l}$ das suspensões de esferas de látex não diluídas (MC – ND) de $5,0 \times 10^6/\text{ml}$, $10,0 \times 10^6/\text{ml}$, $15,0 \times 10^6/\text{ml}$, $25,0 \times 10^6/\text{ml}$ e $50,0 \times 10^6/\text{ml}$ foram colocadas e contadas na câmara de Makler. Cada suspensão estoque foi diluída na proporção de 1:2 com água destilada (CM – H₂O), plasma seminal (CM – PS) e um crioprotetor (MC – CP) composto de proteína de gema de ovo, glicerol e gentamicina (FUJIFILM Irvine Scientific, Santa Ana, Estados Unidos da América) e também contados da câmara de Makler (MAKLER, 1980).

Figura 13 – Contagem de esferas de látex



Fonte: Imagens elaboradas no Laboratório de Citologia Clínica da Universidade Federal de Santa Catarina (LACIT – UFSC) com materiais e amostras do estudo.

Legenda: (A) Esferas de látex no hemocitômetro de Neubauer, foto obtida em aumento de 200x; (B) Esferas de látex na câmara de Makler, foto obtida em aumento de 200x.

2.2 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram realizadas com o software GraphPad Prism® versão 9,5 (GraphPad Software, San Diego, Estados Unidos da América).

O viés fixo entre os métodos foi testado por teste t pareado em casos de distribuição normal e por teste de postos sinalizados de Wilcoxon para casos de distribuição não-normal. A comparação entre as concentrações obtidas nas duas câmaras foi realizada usando limites de concordância de acordo com o método descrito por Bland e Altman (BLAND; ALTMAN, 1986). Para a análise, a diferença de concentração entre os dois métodos foi plotada contra a média. A concentração obtida no hemocitômetro de Neubauer foi considerada referência. No gráfico de Bland e Altman, os limites de concordância foram estimados a partir da média e

intervalo de confiança de 95% (1,96 desvios padrões) da diferença de concentração entre os dois métodos (BLAND; ALTMAN, 1999). A diferença percentual [$100 \times (\text{concentração obtida pelo hemocitômetro de Neubauer} - \text{concentração obtida pela câmara de Makler}) \div \text{média}$] também foi calculada e plotada contra a média das concentrações no gráfico de Bland e Altman. Análise de regressão linear foi feita para determinar se a diferença entre as medidas mudaria dependendo da faixa de concentração analisada.

Coefficientes de variação e viés relativo ((concentração de estudo - concentração alvo) \times 100) foram calculados para as análises de contagens de esferas de látex entre o hemocitômetro de Neubauer e a câmara de Makler. O teste de Bartlett foi utilizado para avaliar a homogeneidade das variâncias. O teste de análise de variância (ANOVA) de Welch com teste post hoc de comparação múltipla (T3 de Dunnett) foi usado para determinar se havia diferença estatisticamente significativa entre os grupos testando diferença entre médias.

3 RESULTADOS

Todas as 241 amostras analisadas no estudo tiveram determinação de concentração pelo hemocitômetro de Neubauer, porém a determinação de concentração pela câmara de Makler não foi realizada em 20 das 241 amostras. As 20 primeiras amostras foram excluídas, pois a análise foi realizada sem a imobilização dos espermatozoides em banho-maria. A análise com os espermatozoides em movimento contribui para a contagem do mesmo espermatozoide mais de uma vez. Além disso, azoospermia foi observada em 9 amostras. Dessa forma o estudo de comparação entre o hemocitômetro de Neubauer e a câmara de Makler para determinação de concentração foi realizado em 212 amostras.

3.1 GARANTIA DA QUALIDADE PARA MEDIDA DE CONCENTRAÇÃO UTILIZANDO ESFÉRAS DE LÁTEX

A comparação da contagem de esferas de látex entre o hemocitômetro de Neubauer e a câmara de Makler está detalhada na tabela 12. O coeficiente de

variação (CV) foi calculado para todas as medições como um índice de precisão e o viés relativo (VR) como um índice de acurácia.

As medidas no hemocitômetro de Neubauer demonstraram os melhores índices de precisão no estudo com CV variando de 3,01% a 6,67%, enquanto as medidas na câmara de Makler para suspensões de esferas não diluídas (CM – ND) variaram de 8,85% a 16,1%. Quando as suspensões de esferas diluídas na proporção de 1:2 foram avaliadas na câmara de Makler, o CV variou de 8,46% a 25,6% para diluição com água (CM – H₂O), de 11,8% a 18,6% para diluição com plasma seminal (CM – PS) e de 9,31% a 12,6% para diluição com crioprotetor (CM – CP). O CV para ambas as câmaras foi o mais alto na concentração alvo de esferas de látex de $5,0 \times 10^6/\text{ml}$ e diminuiu gradualmente para valores de concentração mais elevados.

As medidas na câmara de Makler superestimaram as concentrações de esferas de látex em maiores proporções quando comparado às medias feitas no hemocitômetro de Neubauer para todas as concentrações alvo de esferas de látex. O viés relativo para as determinações do hemocitômetro de Neubauer variou de 0,12% (da concentração alvo de $25,0 \times 10^6/\text{ml}$) a uma superestimação de 8,40% (da concentração alvo de $5,0 \times 10^6/\text{ml}$). Entre as determinações na câmara de Makler, o maior viés relativo foi encontrado para a suspensão não diluída com uma superestimação de 38,0% do valor alvo de $5,0 \times 10^6/\text{ml}$ e o menor viés foi encontrado para a suspensão de esferas de $10,0 \times 10^6/\text{ml}$ diluída com plasma seminal com uma superestimação de 7,6% do valor alvo.

Tabela 12 – Comparação de contagens de esferas de látex obtidas no hemocítômetro de Neubauer e na câmara de Makler

Concentração alvo de esferas de látex ($10^6/\text{ml}$)	Método de contagem	n	Média ($10^6/\text{ml}$)	DP	CV (%)	Viés relativo (%)
5,0	HN	10	5,42	0,36	6,67	8,40
	CM – ND	10	6,90	1,11	16,1	38,0
	CM - H ₂ O	10	5,94	1,52	25,6	18,8
	CM – PS	10	6,20	1,15	18,6	24,0
	CM - CP	10	6,70	0,84	12,6	34,0
10,0	HN	10	10,2	0,51	5,05	2,10
	CM – ND	10	12,8	1,72	13,5	27,6
	CM - H ₂ O	10	11,4	0,97	8,52	14,4
	CM – PS	10	10,8	1,91	17,7	7,60
	CM - CP	10	11,7	1,27	10,8	16,7
15,0	HN	10	15,5	0,65	4,22	3,13
	CM – ND	10	18,2	2,28	12,6	21,1
	CM - H ₂ O	10	16,6	1,40	8,46	10,7
	CM – PS	10	17,3	2,14	12,4	15,3
	CM - CP	10	17,1	1,65	9,62	14,1
25,0	HN	10	25,0	0,80	3,18	0,12
	CM – ND	10	27,8	1,94	6,98	11,0
	CM - H ₂ O	10	29,0	3,10	10,7	15,8
	CM – PS	10	28,9	3,92	13,6	15,4
	CM - CP	10	27,8	3,11	11,2	11,0
50,0	HN	10	50,4	1,52	3,01	0,76
	CM – ND	10	54,0	3,70	6,85	8,04
	CM - H ₂ O	10	53,9	5,43	10,1	7,80
	CM – PS	10	57,7	6,78	11,8	15,4
	CM - CP	10	55,7	5,19	9,31	11,4

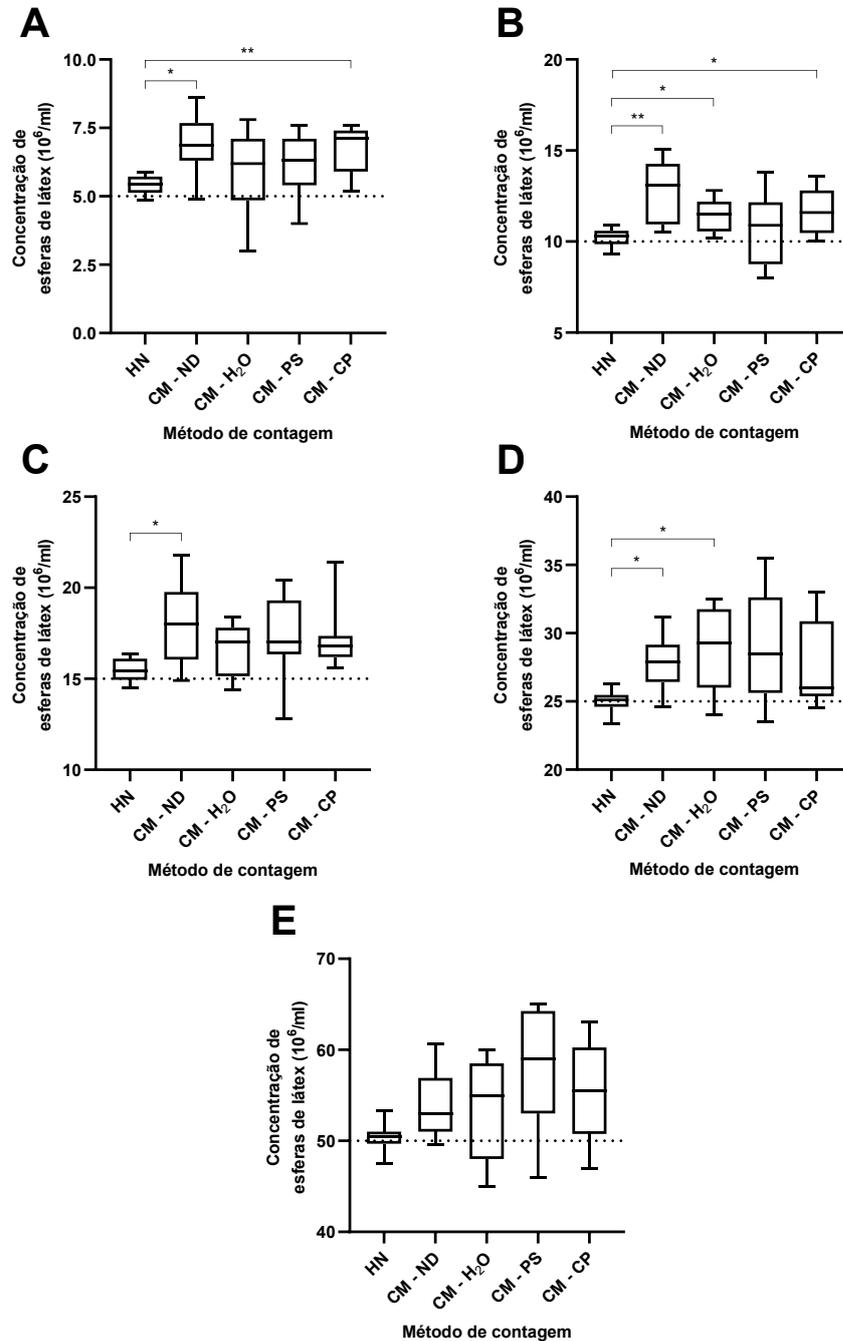
Fonte: elaborado pela autora.

Legenda: HN = hemocítômetro de Neubauer; CM – ND = contagens na câmara de Makler de suspensões de esferas de látex não diluídas; CM – H₂O = contagens na câmara de Makler de suspensões de esferas de látex diluídas em água destilada na proporção de 1:2; CM – PS = contagens na câmara de Makler de suspensões de esferas de látex diluídas em plasma seminal na proporção de 1:2; CM – CP = contagens na câmara de Makler de suspensões de esferas de látex diluídas em crioprotetor na proporção de 1:2; n = número de amostras; DP = desvio padrão; CV = coeficiente de correlação.

O diagrama box e whiskers na figura 14 mostra a distribuição das medições feitas com o hemocitômetro de Neubauer e com a câmara de Makler para cada um dos valores alvo de esferas de látex. Todas as medidas apresentaram distribuição normal, porém ficou claro que os dados não apresentaram variância igual entre os grupos, o que foi confirmado pelo teste de Bartlett ($p < 0,05$) para todos os grupos. Uma vez que houve violação da suposição de homogeneidade de variâncias, o teste de ANOVA de Welch com post hoc de comparação múltipla (T3 de Dunnett) foi usado para determinar se havia diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

Na concentração alvo de $5,0 \times 10^6/\text{ml}$ (figura 14A), houve diferença estatística entre as análises nos grupos HN e CM – ND ($p = 0,0177$) e entre HN e CM – CP ($p = 0,0076$). Na concentração alvo de $10,0 \times 10^6/\text{ml}$ (figura 14B), houve diferença estatística entre HN e CM – ND ($p = 0,0084$), entre HN e CM – H₂O ($p = 0,0305$) e entre HN e CM – CP ($p = 0,0476$). Na concentração alvo de $15,0 \times 10^6/\text{ml}$ (figura 14C), houve diferença estatística somente entre HN e CM – ND ($p = 0,0414$). Na concentração alvo de $25,0 \times 10^6/\text{ml}$ (figura 14D), houve diferença estatística entre os grupos HN e CM – ND ($p = 0,0132$) e entre HN e CM – H₂O ($p = 0,0268$). Não houve diferença estatística entre os grupos na concentração alvo de $50,0 \times 10^6/\text{ml}$ (figura 14E).

Figura 14 – Diagrama de box e whiskers com as diferenças de distribuição das medições feitas com o hemocitômetro de Neubauer e com a câmara de Makler para determinação de concentração de látex



Fonte: Elaborado pela autora.

Legenda: Diagrama de box e whiskers mostrando resultados das contagens de esferas de látex no hemocitômetro de Neubauer (HN), contagens na câmara de Makler de suspensões de esferas de látex não diluídas (CM – ND), contagens na câmara de Makler de suspensões de esferas de látex diluídas em água destilada na proporção de 1:2 (CM – H₂O), em plasma seminal (CM – OS) e em crioprotetor (CM – CP) nas concentrações avo de (A) $5,0 \times 10^6/\text{ml}$, (B) $10,0 \times 10^6/\text{ml}$, (C) $15,0 \times 10^6/\text{ml}$, (D) $25,0 \times 10^6/\text{ml}$ e (E) $50,0 \times 10^6/\text{ml}$. A caixa do diagrama contém o quartil inferior (25º percentil), o quartil superior (75º percentil) e a mediana no centro. Os whiskers representam o mínimo e o máximo. As linhas pontilhadas representam os valores de concentração alvo. A diferença significativa entre os grupos foi determinada com ANOVA de Welch com post hoc de comparação múltipla T3 de Dunnett, $p < 0,05$ (*) e $p > 0,01$ (**).

3.2 COMPARAÇÃO ENTRE O HEMOCITÔMETRO DE NEUBAUER E A CÂMARA DE MAKLER PARA DETERMINAÇÃO DE CONCENTRAÇÃO DE ESPERMATOZOIDES

A concentração de espermatozoides determinada no hemocitômetro de Neubauer variou de $70,0 \times 10^3/\text{ml}$ a $325,30 \times 10^6/\text{ml}$, já na determinação pela câmara de Makler variou de $10,0 \times 10^4/\text{ml}$ a $307,7 \times 10^6/\text{ml}$. A média da concentração para cada um dos dois métodos de contagem está descrita na tabela 13.

Tabela 13 – Comparação da concentração de espermatozoides ($10^6/\text{ml}$) obtida pelo hemocitômetro de Neubauer e pela câmara de Makler

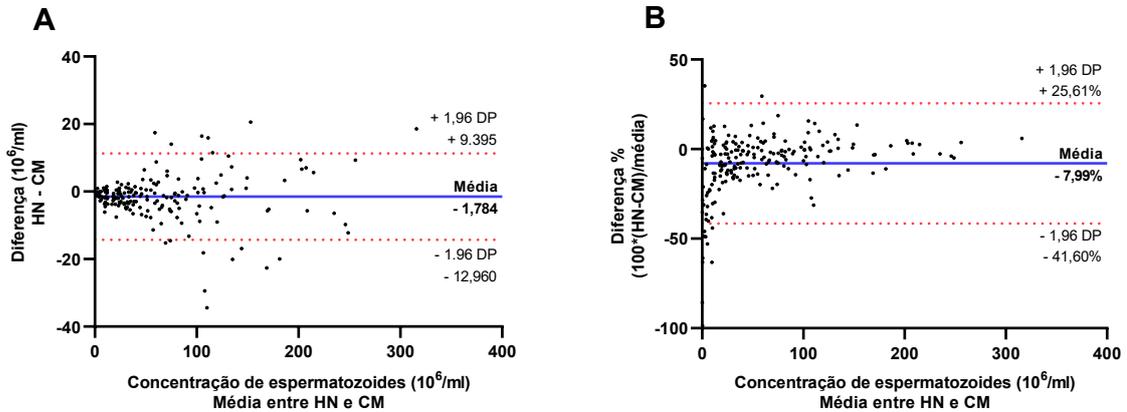
Método de contagem de espermatozoides	n	Média ($10^6/\text{ml}$)	DP	IC 95% inferior	IC 95% superior
Hemocitômetro de Neubauer	212	57,3	58,5	49,4	65,2
Câmara de Makler	212	58,8	58,4	50,9	66,7

Fonte: elaborada pela autora.

Legenda: n = número de amostras; DP = desvio padrão; IC = intervalo de confiança.

Os gráficos de Bland e Altman são mostrados na Figura 15. O viés (diferença média) foi estimado em -1,51 e os limites de concordância foram de -14,30 a 11,28 para análise de concordância entre os dois métodos usando os dados brutos ($10^6/\text{ml}$). Um efeito de funil pode ser observado na comparação, em que a variação da diferença foi menor para valores de baixa concentração de espermatozoides e aumentou conforme as concentrações se tornaram mais altas (Figura 15A). Por essa razão, os limites de concordância foram reavaliados após transformação dos dados em diferença percentual (Figura 15B). O viés foi estimado em -7,99% e os novos limites de concordância variaram de -41,6% a 25,6%. O viés fixo foi significativo entre o hemocitômetro de Neubauer e a câmara de Makler determinado por teste t ($p < 0,0001$).

Figura 15 – Gráficos de Bland e Altman para determinação de concentração de espermatozoides pelo hemocitômetro de Neubauer e pela câmara de Makler

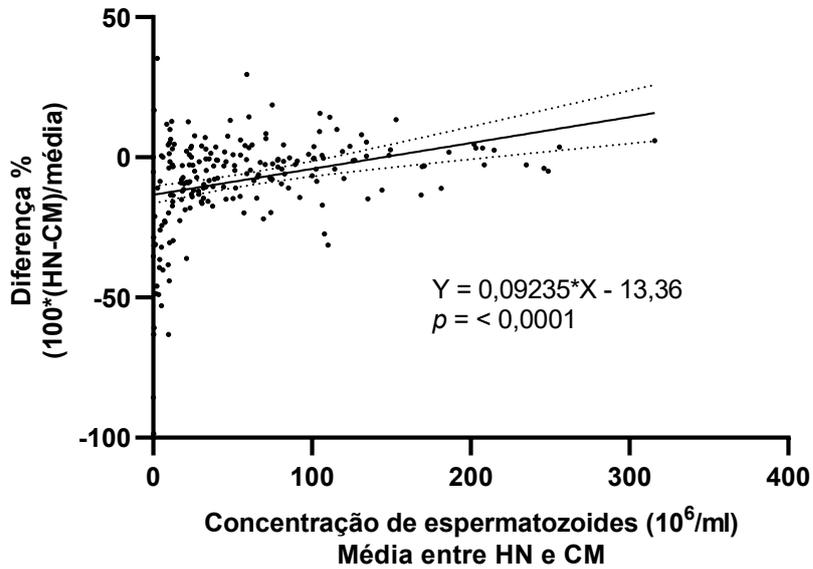


Fonte: Elaborado pela autora.

Legenda: Gráficos de Bland e Altman mostrando a diferença média (linha azul sólida) e limites de concordância (diferença média \pm 1.96 desvios padrões (DP), linhas vermelhas pontilhadas) entre a estimativa de concentração de espermatozoides no hemocitômetro de Neubauer (HN) e a câmara de Makler (CM) em função de (A) diferença ($10^6/\text{ml}$) em relação à média e (B) diferença percentual (%) em relação a média.

Foi possível observar no gráfico de Bland e Altman de diferença percentual em relação à média da concentração de espermatozoides (Figura 15B) que a câmara de Makler produziu valores que divergiram progressivamente dos do hemocitômetro de Neubauer ao longo da faixa de concentração. A câmara de Makler superestimou os resultados da concentração de espermatozoides em maiores proporções para valores de baixa concentração quando comparado a valores de concentração mais altos. Esse viés proporcional foi confirmado por análise de regressão linear ($p < 0,0001$) (Figura 16). Para investigar melhor esse comportamento, as concentrações de espermatozoides foram subdivididas em $< 16,0 \times 10^6/\text{ml}$, $16,0$ a $40,0 \times 10^6/\text{ml}$, $40,0$ a $80,0 \times 10^6/\text{ml}$ e $> 80,0 \times 10^6/\text{ml}$ com base nas estimativas feitas com o hemocitômetro de Neubauer. Os valores médios e desvios padrões para as diferentes faixas de concentração estão exibidos na tabela 14 para cada método de contagem.

Figura 16 – Análise de regressão linear mostrando viés proporcional entre a estimativa de concentração de espermatozoides pelo hemocitômetro de Neubauer e pela câmara de Makler



Fonte: Elaborado pela autora.

Legenda: HN = hemocitômetro de Neubauer; CM = câmara de Makler.

Tabela 14 – Comparação de diferentes faixas de concentração de espermatozoides obtidas pelo hemocitômetro de Neubauer e pela câmara de Makler

Intervalo de concentração (10 ⁶ /ml)	Método de contagem	n	Média (10 ⁶ /ml)	DP	IC 95% inferior	IC 95% superior
< 16,0	HN	56	6,437	4,54	5,220	7,654
	CM	56	7,328	4,88	6,021	8,635
16,0 a 40,0	HN	54	26,87	6,78	25,02	28,72
	CM	54	28,65	6,95	26,76	30,55
40,0 a 80,0	HN	48	59,54	11,37	56,24	62,84
	CM	48	61,33	12,58	57,67	64,98
> 80,0	HN	54	138,5	55,10	123,5	153,5
	CM	54	140,1	53,84	125,4	154,8

Fonte: elaborado pela autora.

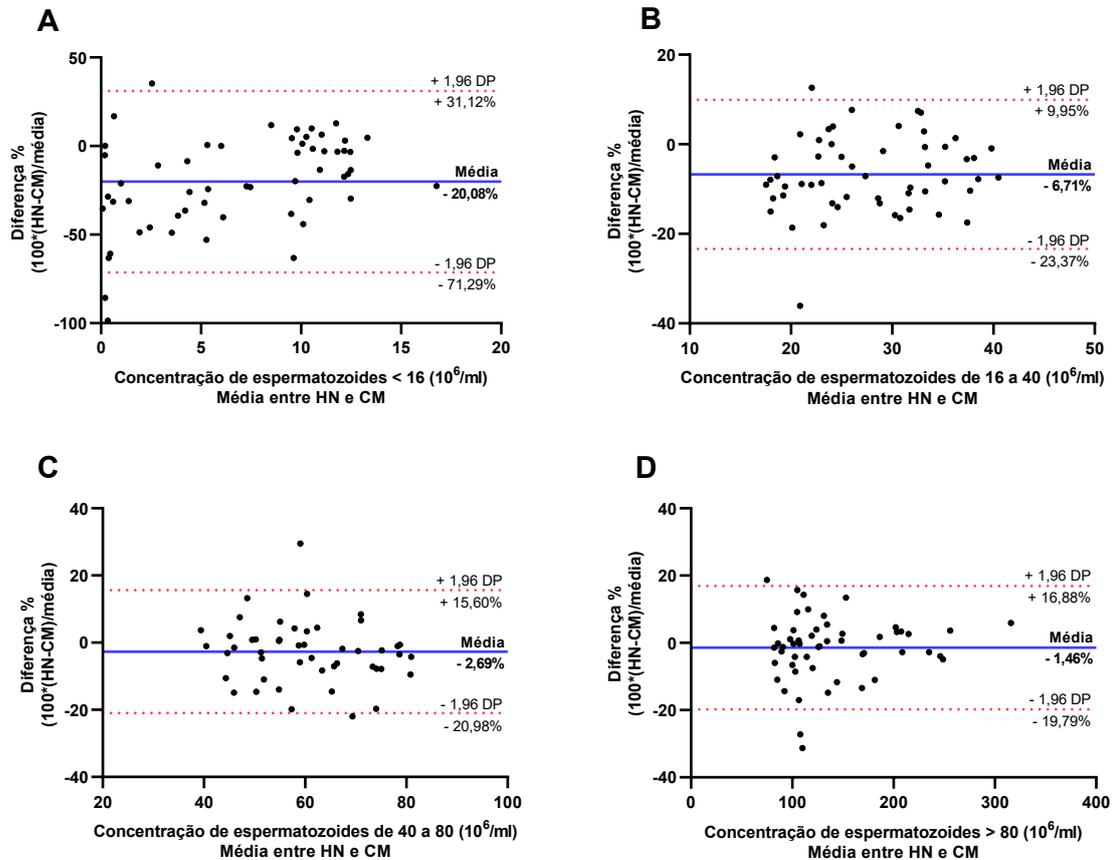
Legenda: HN = hemocitômetro de Neubauer; CM = câmara de Makler; n = número de amostras; DP = desvio padrão; IC = intervalo de confiança.

Viés fixo foi encontrado para os valores de concentração inferiores a $16,0 \times 10^6/\text{ml}$ ($p < 0,0001$) e para a faixa de $16,0$ a $40,0 \times 10^6/\text{ml}$ ($p < 0,0001$), mas não para a faixa de $40,0$ a $80,0 \times 10^6/\text{ml}$ ($p = 0,052$) ou para valores de concentração superiores a $80,0 \times 10^6/\text{ml}$ ($p = 0,421$).

Vinte e três (10,8%) amostras apresentaram viscosidade elevada. Para investigar se a viscosidade aumentada poderia influenciar a avaliação, os resultados de viscosidade alterada foram separados dos resultados de viscosidade normal. Viés fixo ainda foi encontrado quando as amostras de alta viscosidade foram retiradas da análise para valores de concentração inferiores a $16,0 \times 10^6/\text{ml}$ ($p < 0,0001$) e para a faixa de $16,0$ a $40,0 \times 10^6/\text{ml}$ ($p < 0,0001$), mas não para a faixa de $40,0$ a $80,0 \times 10^6/\text{ml}$ ($p = 0,077$) ou para valores de concentração superiores a $80,0 \times 10^6/\text{ml}$ ($p = 0,639$). Como viscosidade elevada não influenciou o viés fixo, os gráficos de Bland e Altman para as diferentes faixas de concentração incluíram essas amostras.

A presença de viés fixo em faixas menores de concentração pode ser observada nos gráficos de Bland e Altman na figura 17. Para valores de concentração espermática inferiores a $16,0 \times 10^6/\text{ml}$, a câmara de Makler superestimou as contagens do hemocítmetro de Neubauer em uma média de 20,08%, enquanto na faixa de $16,0$ a $40,0 \times 10^6/\text{ml}$, a câmara de Makler apresentou superestimação de concentração de em média 6,71%. Para concentrações maiores a diferença percentual foi mais próxima de zero, com superestimação não significativa de 2,69% e 1,46% para a faixa de $40,0$ a $80,0 \times 10^6/\text{ml}$ e para concentrações superiores a $80,0 \times 10^6/\text{ml}$, respectivamente. Alguns *outliers* (diferenças fora dos limites de concordância) podem ser observados nos gráficos de Bland e Altman. Esses erros de medição ocorreram uniformemente nas diferentes faixas de concentração de espermatozoides.

Figura 17 – Gráficos de Bland e Altman para determinação de diferentes subdivisões de concentração de espermatozoides de pelo hemocitômetro de Neubauer e pela câmara de Makler



Fonte: Elaborado pela autora.

Legenda: Gráfico de Bland e Altman mostrando diferença percentual média (linha sólida azul) e limites de concordância (diferença $\pm 1,96$ desvios padrões (DP), linhas pontilhadas vermelhas) para as estimativas de concentração no hemocitômetro de Neubauer (HN) e na câmara de Makler (CM) nas subdivisões de (A) < 16,0 x $10^6/ml$, (B) 16,0 a 40,0 x $10^6/ml$, (C) 40,0 a 80,0 x $10^6/ml$ e (D) > 80 x $10^6/ml$.

4 DISCUSSÃO

O aumento da concentração de espermatozoides influencia o tempo de gravidez até o valor de $55,0 \times 10^6/ml$ (SLAMA et al., 2002). Portanto, a determinação da concentração de espermatozoides possui um valor clínico importante. O manual de laboratório da OMS para exame e processamento do sêmen humano descreve minuciosamente a melhor maneira de avaliar a concentração de espermatozoides (WHO, 2021), no entanto, muitos laboratórios que incluem a análise de sêmen em sua rotina sofrem com a falta de padronização (BJÖRND AHL et al., 2016). Assim, a determinação correta da concentração é fundamental em um cenário clínico, uma

vez que uma avaliação imprecisa pode levar a erros diagnósticos e seleção equivocada da estratégia de seguimento do paciente (DARDMEH; HEIDARI; ALIPOUR, 2021; PENG; ZOU; LI, 2015).

A câmara de Makler foi introduzida pela primeira vez em 1978 como um alternativa para facilitar a contagem de espermatozoides (MAKLER, 1978). Desde então, a câmara de Makler foi incorporada por muitos laboratórios de andrologia. Estudos realizados no Brasil relacionados a avaliação da qualidade do sêmen relataram o uso da câmara de Makler (BORGES et al., 2015; GLINA et al., 2010; PASQUALOTTO et al., 2006; SIQUEIRA et al., 2020). Álvarez e colaboradores (2005) relataram que 100% dos laboratórios que participaram de um programa de controle da qualidade de análise do sêmen realizado na Espanha utilizavam a câmara de Makler em 1998. Ao final do período da pesquisa em 2002, 67,5% dos laboratórios permaneceram utilizando a câmara de Makler, enquanto 32,5% adotaram o uso do hemocitômetro de Neubauer (ALVAREZ et al., 2005). De forma similar, o uso da câmara de Makler manteve-se estável na China ao longo dos anos com 33,0% dos laboratórios de andrologia usando a câmara em 2009 e 37,0% em 2020 (WANG et al., 2022). Por outro lado, 15 anos de experiência belga com avaliação externa da qualidade viram uma diminuição de 12,0% para 5,0% do uso da câmara de Makler, enquanto o uso do hemocitômetro de Neubauer aumentou de 32,0% para 68,0% entre 1997 e 2012 (PUNJABI et al., 2016). A sexta edição do manual da OMS para análise de sêmen recomenda o uso do hemocitômetro de Neubauer e menciona que outras câmaras podem ser usadas, mas precisam ser primeiro validadas (WHO, 2021). Portanto, é essencial que os métodos de determinação da concentração de espermatozoides sejam precisos e acurados e que práticas internas de garantia da qualidade sejam implantadas.

Conclusões sobre a garantia da qualidade na determinação de espermatozoides entre o hemocitômetro de Neubauer e a câmara de Makler não são unânimes. Uma investigação comparando a contagem de espermatozoides entre o hemocitômetro de Neubauer e a câmara de Makler de 112 ejaculados de homens férteis revelou que ambas as câmaras eram comparáveis, produzindo valores médios de concentração semelhantes (CARDONA-MAYA; BERDUGO; CADAVID, 2008). Em outro estudo, foi detectado maior confiabilidade para a câmara de Makler quando comparado ao hemocitômetro de Neubauer e à câmara de Horwells, com CV de 5,9%, 9,7% e 7,1%, respectivamente. Os autores recomendaram a câmara de

Makler porque esta forneceu valores de concentração intermediários, enquanto o hemocitômetro de Neubauer teria subestimado e a câmara de Horwells teria superestimado a contagem de espermatozoides (IMADE et al., 1993). No entanto, não há garantia de que os valores intermediários encontrados com a câmara de Makler nesse estudo fossem os resultados corretos e tanto a câmara de Makler como a de Horwells poderiam estar superestimando a verdadeira concentração de espermatozoides. Uma maneira de corrigir esse problema é medindo concentrações conhecidas de espermatozoides ou medindo esferas de látex com concentrações conhecidas disponíveis comercialmente.

Em nosso estudo, esferas de látex de concentrações conhecidas foram empregadas para comparar a precisão e a acurácia do hemocitômetro de Neubauer e da câmara de Makler, que são instrumentos comumente utilizados na avaliação de concentração de espermatozoides. Foi possível inferir que as medições obtidas na câmara de Makler superestimaram as concentrações de esferas de látex em maior proporção quando comparado ao hemocitômetro de Neubauer para todas as concentrações investigadas. De maneira semelhante, suspensões padronizadas de esferas de látex foram contadas manualmente no hemocitômetro de Neubauer e na câmara de Makler em outro estudo. As contagens de esferas obtidas com o hemocitômetro não foram estatisticamente diferentes daquelas determinadas por contagem eletrônica de partículas, enquanto as contagens obtidas com a câmara de Makler foram 62% maiores (GINSBURG; ARMANT, 1990). Não encontramos uma diferença das concentrações alvo dessa magnitude com análise utilizando a câmara de Makler em nossa investigação. A maior diferença observada foi de superestimação de 38% durante a contagem da suspensão estoque não diluída de $5,0 \times 10^6/\text{ml}$ de esferas de látex.

Observamos que o hemocitômetro de Neubauer foi mais preciso do que a câmara de Makler, com CV variando de 3,01% a 6,67%, enquanto para a câmara de Makler o CV variou de 8,46% a 25,7%. Semelhante aos nossos resultados, um programa externo de garantia da qualidade na Austrália encontrou um CV de 14,6% para o hemocitômetro de Neubauer, menor do que o observado para a câmara de Makler (24,1%). A câmara de Makler também superestimou as concentrações de esferas de látex com um viés relativo de 17%, enquanto o hemocitômetro de Neubauer subestimou as contagens, com viés relativo de - 2,8% (ZUVELA; MATSON, 2020). Ao invés de implementar esferas de látex, um estudo avaliou

contagens repetidas de amostras de sêmen. Nesse estudo, o hemocitômetro de Neubauer demonstrou CV menor (8,50%) do que o obtido pela câmara de Makler (13,1%) (BAILEY et al., 2007). Johnson e colaboradores (1996) fizeram comparação entre análise manual e análise de sêmen assistida por computador (CASA, do inglês *computer-assisted sperm analysis*) de esferas de látex. Eles observaram que a câmara de Makler superestimou significativamente a concentração de esferas de látex durante as contagens manuais bem como pelo sistema CASA, já o hemocitômetro subestimou a concentração média de esferas, porém a diferença não foi significativa (JOHNSON; BOONE; BLACKHURST, 1996). Da mesma maneira, outro estudo observou o mesmo padrão para ambas as câmaras, mas os autores recomendaram o hemocitômetro de Neubauer por apresentar o menor CV (7,1%) (MAHMOUD et al., 1997). Dessa forma, nossos achados reafirmam o hemocitômetro de Neubauer como o método preciso e acurado para medição de concentração.

A variação entre as medidas realizadas no hemocitômetro de Neubauer e na câmara de Makler pode ser atribuída a diferença na profundidade entre as câmaras e por erro de amostragem. Enquanto o hemocitômetro de Neubauer tem uma profundidade de 100 μm , a câmara de Makler tem uma profundidade de 10 μm . Dessa forma, pequenas alterações por posicionamento inadequado da lamínula resultariam em maiores diferenças na câmara mais rasa. Além disso, quando 200 esferas são contadas em toda a câmara de Makler, a concentração calculada é de $20,0 \times 10^6/\text{ml}$, portanto, para valores de concentração abaixo desse limite, menos de 200 esferas serão contados, o que aumenta o erro de amostragem (PETERS; ZANEVELD; JEYENDRAN, 1993; WHO, 2021). Esse fenômeno foi observado em nosso estudo, no qual concentrações alvo de até $10,0 \times 10^6/\text{ml}$ apresentaram maiores valores de CV e de viés relativo e essas diferenças foram amenizadas com o aumento da concentração.

Atrasar a aplicação da lamínula da câmara de Makler também pode ser um potencial fator de erro, pois as contagens tendem a aumentar progressivamente quanto mais tempo for levado para aplicar a lamínula (MAKLER, 1980). Cuidado foi tomado em nosso estudo para aplicar a lamínula imediatamente após a pipetagem da amostra. Além disso, o meio utilizado para suspender as esferas de látex também deve ser levado em consideração. Matson e colaboradores (1999) observaram que o PBS não fisiológico foi a pior escolha porque as esferas assentam muito rápido na câmara de Makler, resultado em superestimação, enquanto a diluição com soro ou

plasma seminal permite que as esferas se depositem mais devagar nos primeiros 10 segundos (MATSON et al., 1999). Mahmoud e colaboradores (1997) também demonstraram que misturar a suspensão de esferas de látex com plasma seminal leva a uma estimativa correta de concentração (MAHMOUD et al., 1997).

Em nosso estudo, diluímos a suspensão estoque de esferas de látex com PBS. Também diluímos todas as suspensões na proporção de 1:2 com água, plasma seminal e um crioprotetor utilizado durante o congelamento do sêmen. A diluição com PBS apresentou os piores índices de precisão e acurácia no estudo para análise na câmara de Makler. Os valores médios também foram significativamente diferentes das medidas realizadas no hemocitômetro de Neubauer para as suspensões de $5,0 \times 10^6/\text{ml}$, $10,0 \times 10^6/\text{ml}$ e $15,0 \times 10^6/\text{ml}$ também diluídas com PBS. As avaliações com a câmara de Makler de suspensões diluídas em água e crioprotetor também apresentaram médias estatisticamente diferentes das avaliações com o hemocitômetro de Neubauer para as concentrações alvo de $5,0 \times 10^6/\text{ml}$, $10,0 \times 10^6/\text{ml}$ e $25,0 \times 10^6/\text{ml}$. Em concordância com os demais estudos (MAHMOUD et al., 1997; MATSON et al., 1999), a avaliação na câmara de Makler com suspensões de esferas de látex diluídas com plasma seminal foi a única a não apresentar diferença estatística com as medidas realizadas no hemocitômetro de Neubauer até a concentração alvo de $25,0 \times 10^6/\text{ml}$, embora os CV ainda tenham sido inaceitavelmente altos. Observamos também que para a concentração alvo de $50,0 \times 10^6/\text{ml}$, nenhuma diferença foi encontrada entre as câmaras para suspensões de esferas diluídas e não diluídas.

Além das análises de precisão e acurácia para o hemocitômetro de Neubauer e a câmara de Makler com o emprego de esferas de látex, análise de concordância entre as duas câmaras também foi realizada com as amostras de sêmen do estudo. A diferença média entre os dois métodos determinada no gráfico de Bland e Altman foi de $-1,51 \times 10^6/\text{ml}$, mostrando que a câmara de Makler superestimou a concentração espermática em relação ao hemocitômetro de Neubauer ao longo das medições. Comparativamente, um estudo constatou que não houve diferença significativa entre as concentrações médias de espermatozoides com ambas as câmaras, porém após subdivisão das concentrações de espermatozoides, foi observado diferença significativa no grupo com oligozoospermia com superestimação das contagens pela câmara de Makler (MARCHLEWSKA et al., 2010).

Bailey e colaboradores (2007) observaram que a câmara de Makler mostrou concordância pobre com o hemocitômetro de Neubauer, com tendência a superestimar a contagem de espermatozoides. O grupo relatou que a câmara de Makler superestima o hemocitômetro de Neubauer em maiores proporções à medida que a concentração de espermatozoides aumenta (BAILEY et al., 2007). Em nosso estudo observamos o contrário. Verificamos que as diferenças em valores absolutos ($10^6/\text{ml}$) de fato aumentaram com o aumento da concentração espermática, porém um efeito funil foi observado no gráfico. Bland e Altman sugerem que os dados devem ser transformados nesses casos, caso contrário os limites de concordância serão mais amplos do que o necessário para valores de concentração baixos e mais estreitos do que deveriam ser para valores mais altos de concentração (BLAND; ALTMAN, 1999).

Optamos por transformar os dados em diferenças percentuais porque os resultados seriam mais fáceis de serem interpretados. Observamos que a câmara de Makler superestimou a concentração de espermatozoides com um viés médio de - 7,99% quando comparada ao hemocitômetro de Neubauer. A superestimação ocorreu em maior proporção para valores de concentração mais baixos quando comparados a valores de concentração mais altos, o que foi confirmado por análise de regressão linear. Em seguida, analisamos diferentes faixas de concentração de espermatozoides para determinar a magnitude com que a câmara de Makler superestimou cada uma das diferentes faixas. Diferença sistemática foi encontrada entre as câmaras quando foram avaliadas faixas de concentração inferiores a $40,0 \times 10^6/\text{ml}$. Limites de concordância amplos foram encontrados para avaliação de concentrações inferiores a $16,0 \times 10^6/\text{ml}$, especialmente para casos de oligozoospermia grave (concentração espermática inferior a $5,0 \times 10^6/\text{ml}$). Como as faixas mais baixas de concentração de espermatozoides, especialmente aquelas próximas ao limite de referência, são as mais importantes para as decisões clínicas, uma determinação precisa é fundamental. Ao contrário da análise com esferas de látex, no qual diluição com plasma seminal diminuiu a diferença entre as duas câmaras, não observamos esse mesmo comportamento na análise com amostras de sêmen para concentrações mais baixas. Isso provavelmente se deve porque na diluição das esferas de látex, plasma seminal foi separado de um único participante e utilizado em todas as diluições. Já na análise de amostras do estudo, a heterogeneidade inerente a cada amostra de sêmen associada a maiores erros de

amostragem em amostras de baixa concentração pode ter contribuído para gerar maior discrepância.

Análise de concentração de espermatozoides pelo hemocitômetro de Neubauer também apresentará algum grau de erro analítico, seja pela viscosidade e heterogeneidade inerente ao sêmen ou mesmo pelas etapas de diluição que não são necessárias para a avaliação na câmara de Makler. Utilizamos pipetas de deslocamento negativo em nosso estudo porque não tínhamos disponíveis em nosso laboratório as pipetas de deslocamento positivo recomendadas pelo manual da OMS (WHO, 2021). Observamos que amostras com alta viscosidade não influenciaram nossos resultados e a eliminação dessas amostras não erradicou a diferença sistemática entre o hemocitômetro de Neubauer e a câmara de Makler para concentrações espermáticas inferiores a $40,0 \times 10^6/\text{ml}$.

Boa concordância entre o hemocitômetro de Neubauer e a câmara de Makler foi encontrada para valores de concentração espermática superiores a $40,0 \times 10^6/\text{ml}$ em nosso estudo, com diferenças médias mais próximas de zero e limites de concordância mais estreitos. Como a maioria das determinações de concentração de espermatozoides de homens da população geral deve render resultados superiores a $40,0 \times 10^6/\text{ml}$ (LEVINE et al., 2022), não deve haver grande impacto nos resultados de laboratórios que preferem a câmara de Makler se esses laboratórios realizarem espermogramas somente em homens potencialmente não inférteis, como homens jovens selecionados para o serviço militar, por exemplo. No entanto, essa não é a realidade da maioria dos laboratórios de andrologia, pois geralmente são focados na avaliação de homens em investigação de infertilidade e a maioria dos problemas de infertilidade em homens está associada a baixas concentrações de espermatozoides (KUMAR; SINGH, 2015; LEAVER, 2016). Dessa forma, se valores de concentração inferiores a $40,0 \times 10^6/\text{ml}$ forem detectados pela câmara de Makler, a avaliação com o hemocitômetro de Neubauer deve ser realizada para garantir que os resultados sejam acurados e precisos.

Uma limitação na comparação entre o hemocitômetro de Neubauer e a câmara de Makler foi a utilização de pipetas de deslocamento negativo para as análises. Pipetas de descolamento positivo são recomendadas para a transferência de amostras viscosas. Não observamos diferença quando separamos as amostras mais viscosas da análise, porém idealmente a análise deveria ter sido realizada comparando as duas formas de pipetagem diretamente.

5 CONCLUSÃO

O uso de suspensões padronizadas de esferas de látex disponíveis comercialmente se mostrou adequado para avaliar a qualidade da medição de dispositivos de contagem de espermatozoide. As estimativas no hemocitômetro de Neubauer foram mais precisas e acuradas do que na câmara de Makler, mostrando mais consistência entre as contagens e resultados mais próximos das concentrações alvo, respectivamente. Além disso, medidas com a câmara de Makler mostraram maior grau de superestimação quando comparadas com as determinações no hemocitômetro de Neubauer. Avaliações na câmara de Makler com suspensões de esferas de látex diluídas com plasma seminal apresentaram resultados mais próximos dos estimados no hemocitômetro de Neubauer até a concentração alvo de $25,0 \times 10^6/\text{ml}$. Nenhuma diferença estatística foi encontrada entre os métodos na avaliação de suspensões de esferas de látex não diluídas ou diluídas para a concentração alvo de $50,0 \times 10^6/\text{ml}$.

Na avaliação com amostras de sêmen, a concordância entre o hemocitômetro de Neubauer e a câmara de Makler foi ruim para valores de concentração espermática inferiores a $40,0 \times 10^6/\text{ml}$, com maior discrepância para amostras com oligozoospermia. A avaliação de concentração de espermatozoides com a câmara de Makler apresenta risco de superestimar os resultados e embora a qualidade da medição tenha melhorado gradualmente para valores de concentrações mais altos, a câmara de Makler se mostrou um substituto ruim para o hemocitômetro de Neubauer para avaliação de amostras de baixa concentração. Laboratórios de andrologia devem estabelecer claramente qual método está sendo empregado para a avaliação da concentração de espermatozoides para que o clínico possa ser informado sobre a incerteza da medida com a câmara de Makler durante a investigação de infertilidade masculina.

CONCLUSÕES GERAIS

Alguns aspectos de hábitos de vida como relato de cirurgia pélvica, depressão, uso por mais de 5 horas de telefone celular, varicocele e sintomas graves ou hospitalização por COVID-19 foram associados ao prejuízo de parâmetros espermáticos. Maior dano à integridade da cromatina espermática foi associada a redução de concentração de espermatozoides, enquanto amostras com menor dano da cromatina apresentaram concentração estável após três horas tanto em estufa como em geladeira. Além de testes de rotina, a avaliação de dano à integridade da cromatina com azul de toluidina pode ser um método alternativo simples e barato para avaliar a capacidade funcional de espermatozoides. Por fim, a câmara de Makler é um substituto ruim para determinar a concentração espermática e as medições apresentam maior precisão e acurácia com o hemocitômetro de Neubauer.

REFERÊNCIAS

- AFEICHE, M. et al. Dairy food intake in relation to semen quality and reproductive hormone levels among physically active young men. **Human Reproduction (Oxford, England)**, v. 28, n. 8, p. 2265–2275, ago. 2013.
- AGARWAL, A. et al. Effect of cell phone usage on semen analysis in men attending infertility clinic: an observational study. **Fertility and Sterility**, v. 89, n. 1, p. 124–128, jan. 2008.
- AGARWAL, A. et al. Reactive oxygen species and sperm DNA damage in infertile men presenting with low level leukocytospermia. **Reproductive biology and endocrinology: RB&E**, v. 12, p. 126, 19 dez. 2014.
- AGARWAL, A. et al. A unique view on male infertility around the globe. **Reproductive Biology and Endocrinology : RB&E**, v. 13, abr. 2015.
- AGARWAL, A. et al. Role of oxidative stress, infection and inflammation in male infertility. **Andrologia**, v. 50, n. 11, p. e13126, dez. 2018.
- AGARWAL, A. et al. Sperm DNA Fragmentation: A New Guideline for Clinicians. **The World Journal of Men's Health**, v. 38, n. 4, p. 412–471, out. 2020.
- AGARWAL, A. et al. Male infertility. **Lancet (London, England)**, v. 397, n. 10271, p. 319–333, 23 jan. 2021.
- AGARWAL, A.; CHO, C.-L.; ESTEVES, S. C. Should we evaluate and treat sperm DNA fragmentation? **Current Opinion in Obstetrics & Gynecology**, v. 28, n. 3, p. 164–171, 2016.
- AITKEN, R. J. et al. New insights into sperm physiology and pathology. **Handbook of Experimental Pharmacology**, n. 198, p. 99–115, 2010.
- AITKEN, R. J. Reactive oxygen species as mediators of sperm capacitation and pathological damage. **Molecular Reproduction and Development**, v. 84, n. 10, p. 1039–1052, out. 2017.
- AKSAK, T. et al. Investigation of the effect of COVID-19 on sperm count, motility, and morphology. **Journal of Medical Virology**, v. 94, n. 11, p. 5201–5205, nov. 2022.
- AL-ASADI, A. M.; KLEIN, B.; MEYER, D. Multiple Comorbidities of 21 Psychological Disorders and Relationships With Psychosocial Variables: A Study of the Online Assessment and Diagnostic System Within a Web-Based Population. **Journal of Medical Internet Research**, v. 17, n. 3, fev. 2015.
- ALVAREZ, C. et al. External quality control program for semen analysis: Spanish experience. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 22, n. 11–12, p. 379–387, dez. 2005.

ANAMTHATHMAKULA, P.; WINUTHAYANON, W. Mechanism of semen liquefaction and its potential for a novel non-hormonal contraception†. **Biology of Reproduction**, v. 103, n. 2, p. 411–426, 4 ago. 2020.

ANGER, J. T.; SHERMAN, N. D.; WEBSTER, G. D. Ejaculatory profiles and fertility in men after posterior urethroplasty for pelvic fracture-urethral distraction defect injuries. **BJU international**, v. 102, n. 3, p. 351–353, ago. 2008.

ANVISA. **Relatório do sistema nacional de produção de embriões**: Sisembrio. Brasil: Ministério da Saúde - Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2022. Disponível em: <<https://www.gov.br/anvisa/pt-br/centraisdeconteudo/publicacoes/sangue-tecidos-celulas-e-orgaos/relatorios-de-producao-de-embrioes-sisembrio>>. Acesso em: 9 jan. 2023.

APPELL, R. A.; EVANS, P. R. The Effect Of Temperature On Sperm Motility And Viability*. **Fertility and Sterility**, v. 28, n. 12, p. 1329–1332, 1 dez. 1977.

AUGER, J. et al. Decline in semen quality among fertile men in Paris during the past 20 years. **The New England Journal of Medicine**, v. 332, n. 5, p. 281–285, 2 fev. 1995.

BAAZEEM, A. et al. Varicocele and male factor infertility treatment: a new meta-analysis and review of the role of varicocele repair. **European Urology**, v. 60, n. 4, p. 796–808, out. 2011.

BABORE, A. et al. Male factor infertility and lack of openness about infertility as risk factors for depressive symptoms in males undergoing assisted reproductive technology treatment in Italy. **Fertility and Sterility**, v. 107, n. 4, p. 1041–1047, abr. 2017.

BACCARO, L. F. et al. Decline in semen quality of Brazilian men investigated for infertility in the last 27 years. **Fertility and Sterility**, v. 108, n. 3, p. e325, set. 2017.

BAILEY, E. et al. ANDROLOGY LAB CORNER*: Validation of Sperm Counting Methods Using Limits of Agreement. **Journal of Andrology**, v. 28, n. 3, p. 364–373, 2007.

BARBAGALLO, F. et al. Evaluation of Sperm Mitochondrial Function: A Key Organelle for Sperm Motility. **Journal of Clinical Medicine**, v. 9, n. 2, p. 363, 29 jan. 2020.

BEEDER, L. A.; SAMPLASKI, M. K. Effect of antidepressant medications on semen parameters and male fertility. **International Journal of Urology: Official Journal of the Japanese Urological Association**, v. 27, n. 1, p. 39–46, jan. 2020.

BELSEY, M. A. **Development and Research Training in Human Reproduction Special Programme of Research. Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Semen-cervical Mucus Interaction: Based on Consultations Held Within**. 1. ed. Singapore: Press Concern, 1980.

BENATTA, M. et al. The impact of nutrition and lifestyle on male fertility. **Archivio Italiano Di Urologia, Andrologia: Organo Ufficiale [di] Societa Italiana Di Ecografia Urologica E Nefrologica**, v. 92, n. 2, jun. 2020.

BHADORIA, S. et al. Sperm parameters and modifiable risk factors in infertile males: An interventional study. **Indian Journal of Public Health Research and Development**, v. 11, n. 7, p. 873–878, 2020.

BHONGADE, M. B. et al. Effect of psychological stress on fertility hormones and seminal quality in male partners of infertile couples. **Andrologia**, v. 47, n. 3, p. 336–342, abr. 2015.

BILLE, C. et al. Parent's age and the risk of oral clefts. **Epidemiology (Cambridge, Mass.)**, v. 16, n. 3, p. 311–316, maio 2005.

BJÖRNDAHL, L. et al. "How to count sperm properly": checklist for acceptability of studies based on human semen analysis. **Human Reproduction (Oxford, England)**, v. 31, n. 2, p. 227–232, fev. 2016.

BJÖRNDAHL, L.; SÖDERLUND, I.; KVIST, U. Evaluation of the one-step eosin-nigrosin staining technique for human sperm vitality assessment. **Human Reproduction (Oxford, England)**, v. 18, n. 4, p. 813–816, abr. 2003.

BLAND, J. M.; ALTMAN, D. G. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. **Lancet (London, England)**, v. 1, n. 8476, p. 307–310, 8 fev. 1986.

BLAND, J. M.; ALTMAN, D. G. Measuring agreement in method comparison studies. **Statistical methods in medical research**, v. 8, n. 2, jun. 1999.

BOITRELLE, F. et al. The Sixth Edition of the WHO Manual for Human Semen Analysis: A Critical Review and SWOT Analysis. **Life**, v. 11, n. 12, p. 1368, 9 dez. 2021.

BORGES, E. et al. Decline in semen quality among infertile men in Brazil during the past 10 years. **International Braz J Urol: Official Journal of the Brazilian Society of Urology**, v. 41, n. 4, p. 757–763, jul. 2015.

BORGHT, M. V.; WYNS, C. Fertility and infertility: Definition and epidemiology. **Clinical Biochemistry**, v. 62, p. 2–10, dez. 2018.

BOYADJIAN, B. **Quanto custam os tratamentos de reprodução assistida**. Disponível em: <<https://forbes.com.br/colunas/2019/05/quanto-custam-os-tratamentos-de-reproducao-assistida/>>. Acesso em: 18 jan. 2023.

BRAUNER, E. V. et al. **Psychological stress, stressful life events, male factor infertility, and testicular function: a cross-sectional study**. **FERTILITY AND STERILITY** STE 800, 230 PARK AVE, NEW YORK, NY 10169 USAELSEVIER SCIENCE INC, , 2020.

BRÄUNER, E. V. et al. Psychological stress, stressful life events, male factor infertility, and testicular function: a cross-sectional study. **Fertility and Sterility**, v. 113, n. 4, p. 865–875, abr. 2020.

BURKMAN, L. J. et al. The hemizona assay (HZA): development of a diagnostic test for the binding of human spermatozoa to the human hemizona pellucida to predict fertilization potential. **Fertility and Sterility**, v. 49, n. 4, p. 688–697, abr. 1988.

CAMPBELL, M. J. et al. Distribution of semen examination results 2020 - A follow up of data collated for the WHO semen analysis manual 2010. **Andrology**, v. 9, n. 3, p. 817–822, maio 2021.

CARDONA-MAYA, W.; BERDUGO, J.; CADAVID, A. Comparación de la concentración espermática usando la cámara de Makler y la cámara de Neubauer. **Actas urol. esp**, p. 443–445, 2008.

CARLSEN, E. et al. Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years. **BMJ (Clinical research ed.)**, v. 305, n. 6854, p. 609–613, set. 1992.

CENTOLA, G. M. et al. Decline in sperm count and motility in young adult men from 2003 to 2013: observations from a U.S. sperm bank. **Andrology**, v. 4, n. 2, p. 270–276, mar. 2016.

CHARAN, J.; BISWAS, T. How to calculate sample size for different study designs in medical research? **Indian Journal of Psychological Medicine**, v. 35, n. 2, p. 121–126, abr. 2013.

CHIAFFARINO, F. et al. Prevalence and incidence of depressive and anxious symptoms in couples undergoing assisted reproductive treatment in an Italian infertility department. **European Journal of Obstetrics, Gynecology, and Reproductive Biology**, v. 158, n. 2, p. 235–241, out. 2011.

CLARKE, R. N. et al. Relationship between psychological stress and semen quality among in-vitro fertilization patients. **Human Reproduction (Oxford, England)**, v. 14, n. 3, p. 753–758, mar. 1999.

CNES. **Cadastro Nacional de Estabelecimentos de Saúde**. Disponível em: <<https://cnes.datasus.gov.br/>>. Acesso em: 18 jan. 2023.

COCHRANE, R.; ROBERTSON, A. The life events inventory: A measure of the relative severity of psycho-social stressors. **Journal of Psychosomatic Research**, v. 17, n. 2, p. 135–139, 1 mar. 1973.

COHEN, S.; KAMARCK, T.; MERMELSTEIN, R. A global measure of perceived stress. **Journal of Health and Social Behavior**, v. 24, n. 4, p. 385–396, dez. 1983.

COOPER, T. G. et al. Ejaculate Volume Is Seriously Underestimated When Semen Is Pipetted or Decanted Into Cylinders From the Collection Vessel. **Journal of Andrology**, v. 28, n. 1, p. 1–4, 2007.

COWARD, R. M. et al. Fertility-Related Quality of Life, Gonadal Function, and Erectile Dysfunction in Male Partners of Couples with Unexplained Infertility. **The Journal of urology**, v. 202, n. 2, p. 379–384, ago. 2019.

CROSNOE, L. E. et al. Exogenous testosterone: a preventable cause of male infertility. **Translational Andrology and Urology**, v. 2, n. 2, p. 106–113, jun. 2013.

CULLEY, L.; HUDSON, N.; LOHAN, M. Where are all the men? The marginalization of men in social scientific research on infertility. **Reproductive Biomedicine Online**, v. 27, n. 3, p. 225–235, set. 2013.

DANIS, R. B.; SAMPLASKI, M. K. Sperm Morphology: History, Challenges, and Impact on Natural and Assisted Fertility. **Current Urology Reports**, v. 20, n. 8, p. 43, 15 jun. 2019.

DARDMEH, F.; HEIDARI, M.; ALIPOUR, H. Comparison of commercially available chamber slides for computer-aided analysis of human sperm. **Systems Biology in Reproductive Medicine**, v. 67, n. 2, p. 168–175, abr. 2021.

DCUNHA, R. et al. Current Insights and Latest Updates in Sperm Motility and Associated Applications in Assisted Reproduction. **Reproductive Sciences (Thousand Oaks, Calif.)**, v. 29, n. 1, p. 7–25, jan. 2022.

DE LAMIRANDE, E.; GAGNON, C. A positive role for the superoxide anion in triggering hyperactivation and capacitation of human spermatozoa. **International Journal of Andrology**, v. 16, n. 1, p. 21–25, fev. 1993.

DEEPINDER, F.; MAKKER, K.; AGARWAL, A. Cell phones and male infertility: dissecting the relationship. **Reproductive Biomedicine Online**, v. 15, n. 3, p. 266–270, set. 2007.

DU PLESSIS, S. S.; GOKUL, S.; AGARWAL, A. Semen hyperviscosity: causes, consequences, and cures. **Frontiers in Bioscience (Elite Edition)**, v. 5, n. 1, p. 224–231, 1 jan. 2013.

ENCYCLOPEDIA BRITANNICA, T. E. OF E. **Spermatogenesis | Description & Process** | **Britannica**. Disponível em: <<https://www.britannica.com/science/spermatogenesis>>. Acesso em: 7 jan. 2023.

ERENPREISA, J. et al. Toluidine blue test for sperm DNA integrity and elaboration of image cytometry algorithm. **Cytometry Part A**, v. 52A, n. 1, p. 19–27, 2003.

ERENPREISS, J. et al. Toluidine blue cytometry test for sperm DNA conformation: comparison with the flow cytometric sperm chromatin structure and TUNEL assays. **Human Reproduction**, v. 19, n. 10, p. 2277–2282, 1 out. 2004.

ESKIOCAK, S. et al. Glutathione and free sulphhydryl content of seminal plasma in healthy medical students during and after exam stress. **Human Reproduction (Oxford, England)**, v. 20, n. 9, p. 2595–2600, set. 2005a.

ESKIOCAK, S. et al. Association between mental stress & some antioxidant enzymes of seminal plasma. **The Indian Journal of Medical Research**, v. 122, n. 6, p. 491–496, dez. 2005b.

ESTEVEES, S. C. Clinical relevance of routine semen analysis and controversies surrounding the 2010 World Health Organization criteria for semen examination. **International Braz J Urol: Official Journal of the Brazilian Society of Urology**, v. 40, n. 4, p. 443–453, jul. 2014.

FARLIN, M. E. et al. Assessment of Pisum sativum agglutinin in identifying acrosomal damage in stallion spermatozoa. **Molecular Reproduction and Development**, v. 32, n. 1, p. 23–27, maio 1992.

FEKI, N. C. et al. Semen quality decline among men in infertile relationships: experience over 12 years in the South of Tunisia. **Journal of Andrology**, v. 30, n. 5, p. 541–547, 2009.

FENSTER, L. et al. Effects of Psychological Stress on Human Semen Quality. **Journal of Andrology**, v. 18, n. 2, p. 194–202, mar. 1997.

FIRNS, S. et al. The effect of cigarette smoking, alcohol consumption and fruit and vegetable consumption on IVF outcomes: a review and presentation of original data. **Reproductive Biology and Endocrinology : RB&E**, v. 13, dez. 2015.

FU, J. et al. Expressions and significances of the angiotensin-converting enzyme 2 gene, the receptor of SARS-CoV-2 for COVID-19. **Molecular Biology Reports**, v. 47, n. 6, p. 4383–4392, 2020.

GATIMEL, N. et al. Sperm morphology: assessment, pathophysiology, clinical relevance, and state of the art in 2017. **Andrology**, v. 5, n. 5, p. 845–862, set. 2017.

GBD 2017 POPULATION AND FERTILITY COLLABORATORS. Population and fertility by age and sex for 195 countries and territories, 1950-2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. **Lancet (London, England)**, v. 392, n. 10159, p. 1995–2051, nov. 2018.

GILL, K. et al. The Negative Impact of Varicocele on Basic Semen Parameters, Sperm Nuclear DNA Dispersion and Oxidation-Reduction Potential in Semen. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 18, n. 11, p. 5977, 2 jun. 2021.

GINSBURG, K. A.; ARMANT, D. R. The influence of chamber characteristics on the reliability of sperm concentration and movement measurements obtained by manual and videomicrographic analysis. **Fertility and Sterility**, v. 53, n. 5, p. 882–887, maio 1990.

GLINA, S. et al. Avaliação dos parâmetros seminais em doadores de sêmen no período de dez anos na cidade de São Paulo. **einstein (São Paulo)**, v. 8, p. 423–429, dez. 2010.

- GOLDIN, C. The Quiet Revolution That Transformed Women's Employment, Education, and Family. **American Economic Review**, v. 96, n. 2, p. 1–21, maio 2006.
- GOLLENBERG, A. L. et al. Semen quality in fertile men in relation to psychosocial stress. **Fertility and Sterility**, v. 93, n. 4, p. 1104–1111, mar. 2010.
- GORE, A. C. et al. EDC-2: The Endocrine Society's Second Scientific Statement on Endocrine-Disrupting Chemicals. **Endocrine Reviews**, v. 36, n. 6, p. E1–E150, dez. 2015.
- GORELICK, J. I.; GOLDSTEIN, M. Loss of fertility in men with varicocele. **Fertility and Sterility**, v. 59, n. 3, p. 613–616, mar. 1993.
- GOSÁLVEZ BERENGUER, J. et al. Fragmentación del ADN espermático. **Revista Internacional de Andrología**, v. 6, n. 3, p. 193–209, 1 set. 2008.
- GREIL, A. L. Infertility and psychological distress: a critical review of the literature. **Social Science & Medicine (1982)**, v. 45, n. 11, p. 1679–1704, dez. 1997.
- GUNES, S.; AL-SADAAN, M.; AGARWAL, A. Spermatogenesis, DNA damage and DNA repair mechanisms in male infertility. **Reproductive Biomedicine Online**, v. 31, n. 3, p. 309–319, set. 2015.
- GUO, T.-H. et al. Semen parameters in men recovered from COVID-19. **Asian Journal of Andrology**, v. 23, n. 5, p. 479–483, 2021.
- GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Tratado de Fisiologia Médica**. 12. ed. Brasil: Elsevier, 2011.
- HABBEMA, J. D. F. et al. Realizing a desired family size: when should couples start? **Human Reproduction (Oxford, England)**, v. 30, n. 9, p. 2215–2221, set. 2015.
- HAMILTON, T. R. D. S.; ASSUMPÇÃO, M. E. O. D. Sperm DNA fragmentation: causes and identification. **Zygote (Cambridge, England)**, v. 28, n. 1, p. 1–8, fev. 2020.
- HARLEV, A. et al. Smoking and Male Infertility: An Evidence-Based Review. **The World Journal of Men's Health**, v. 33, n. 3, p. 143–160, dez. 2015.
- HATCH, E. E. et al. Male cellular telephone exposure, fecundability, and semen quality: results from two preconception cohort studies. **Human Reproduction (Oxford, England)**, v. 36, n. 5, p. 1395–1404, 20 abr. 2021.
- HAZRA, R. et al. In vivo actions of the Sertoli cell glucocorticoid receptor. **Endocrinology**, v. 155, n. 3, p. 1120–1130, mar. 2014.
- HJOLLUND, N. H. I. et al. Reproductive effects of male psychologic stress. **Epidemiology (Cambridge, Mass.)**, v. 15, n. 1, p. 21–27, jan. 2004.
- HOLTMANN, N. et al. Assessment of SARS-CoV-2 in human semen—a cohort study. **Fertility and Sterility**, v. 114, n. 2, p. 233–238, ago. 2020.

HOMA, S. T. et al. Reactive Oxygen Species (ROS) in human semen: determination of a reference range. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 32, n. 5, p. 757–764, maio 2015.

IBGE. **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística | Projeção da população**. Disponível em: <<https://www.ibge.gov.br/apps/populacao/projecao/index.html>>. Acesso em: 9 jan. 2023.

IMADE, G. E. et al. Discrepancies in sperm count using improved Neubauer, Makler, and Horwells counting chambers. **Archives of Andrology**, v. 31, n. 1, p. 17–22, ago. 1993.

JANEVIC, T. et al. Effects of work and life stress on semen quality. **Fertility and sterility**, v. 102, n. 2, p. 530–538, ago. 2014.

JAYASENA, C. N. et al. Prevalence of abnormal semen analysis and levels of adherence with fertility preservation in men undergoing therapy for newly diagnosed cancer: A retrospective study in 2906 patients. **Clinical Endocrinology**, v. 89, n. 6, p. 798–804, dez. 2018.

JENSEN, T. K. et al. High dietary intake of saturated fat is associated with reduced semen quality among 701 young Danish men from the general population. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 97, n. 2, p. 411–418, fev. 2013.

JOHNSON, J. E.; BOONE, W. R.; BLACKHURST, D. W. Manual versus computer-automated semen analyses. Part I. Comparison of counting chambers. **Fertility and Sterility**, v. 65, n. 1, p. 150–155, jan. 1996.

JUREWICZ, J. et al. Occupational, life stress and family functioning: does it affect semen quality? **Annals of Human Biology**, v. 41, n. 3, p. 220–228, maio 2014.

KATZ, P. et al. Costs of infertility treatment: Results from an 18-month prospective cohort study. **Fertility and sterility**, v. 95, n. 3, p. 915–921, mar. 2011.

KESKIN, M. Z. et al. Do cigarette and alcohol affect semen analysis? **Archivio Italiano Di Urologia, Andrologia: Organo Ufficiale [di] Societa Italiana Di Ecografia Urologica E Nefrologica**, v. 88, n. 1, p. 56–59, 31 mar. 2016.

KIM, H.-S. et al. The utility of sperm DNA damage assay using toluidine blue and aniline blue staining in routine semen analysis. **Clinical and Experimental Reproductive Medicine**, v. 40, n. 1, p. 23–28, mar. 2013.

KIM, S. et al. Effects of mobile phone usage on sperm quality – No time-dependent relationship on usage: A systematic review and updated meta-analysis. **Environmental Research**, v. 202, p. 111784, 1 nov. 2021.

KO, E. Y.; SABANEKH, E. S.; AGARWAL, A. Male infertility testing: reactive oxygen species and antioxidant capacity. **Fertility and Sterility**, v. 102, n. 6, p. 1518–1527, 1 dez. 2014.

KOVAC, J. R.; KHANNA, A.; LIPSHULTZ, L. I. The effects of cigarette smoking on male fertility. **Postgraduate Medicine**, v. 127, n. 3, p. 338–341, abr. 2015.

KUMAR, N.; SINGH, A. K. Trends of male factor infertility, an important cause of infertility: A review of literature. **Journal of Human Reproductive Sciences**, v. 8, n. 4, p. 191–196, 2015.

KUSTER, C. Sperm concentration determination between hemacytometric and CASA systems: why they can be different. **Theriogenology**, v. 64, n. 3, p. 614–617, ago. 2005.

LA VIGNERA, S. et al. Does alcohol have any effect on male reproductive function? A review of literature. **Asian Journal of Andrology**, v. 15, n. 2, p. 221–225, mar. 2013.

LAWSON, G.; FLETCHER, R. Delayed fatherhood. **The Journal of Family Planning and Reproductive Health Care**, v. 40, n. 4, p. 283–288, out. 2014.

LEAVER, R. B. Male infertility: an overview of causes and treatment options. **British Journal of Nursing (Mark Allen Publishing)**, v. 25, n. 18, p. S35–S40, 13 out. 2016.

LEDFORD, H. **IVF at 40: revisiting the revolution in assisted reproduction**. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/d41586-018-05792-9>>. Acesso em: 3 jun. 2019.

LEVINE, H. et al. Temporal trends in sperm count: a systematic review and meta-regression analysis. **Human Reproduction Update**, v. 23, n. 6, p. 646–659, nov. 2017.

LEVINE, H. et al. Temporal trends in sperm count: a systematic review and meta-regression analysis of samples collected globally in the 20th and 21st centuries. **Human Reproduction Update**, p. dmac035, 15 nov. 2022.

LI, Y. et al. Socio-psycho-behavioural factors associated with male semen quality in China: results from 1346 healthy men in Chongqing. **The Journal of Family Planning and Reproductive Health Care**, v. 39, n. 2, p. 102–110, abr. 2013.

LIU, X. et al. Single-cell transcriptome analysis of the novel coronavirus (SARS-CoV-2) associated gene ACE2 expression in normal and non-obstructive azoospermia (NOA) human male testes. **Science China. Life Sciences**, v. 63, n. 7, p. 1006–1015, jul. 2020.

LOPES, C. S.; FAERSTEIN, E. Confiabilidade do relato de eventos de vida estressantes em um questionário autopreenchido: Estudo Pró-Saúde. **Brazilian Journal of Psychiatry**, v. 23, p. 126–133, set. 2001.

LUFT, C. D. B. et al. Versão brasileira da Escala de Estresse Percebido: tradução e validação para idosos. **Revista de Saúde Pública**, v. 41, n. 4, p. 606–615, ago. 2007.

LUND, K. H. et al. Perceived stress and semen quality. **Andrology**, v. 11, n. 1, p. 45–53, jan. 2023.

MACDONALD, A. A. et al. The impact of body mass index on semen parameters and reproductive hormones in human males: a systematic review with meta-analysis. **Human Reproduction Update**, v. 16, n. 3, p. 293–311, 2010.

MAEDA, N. et al. Assessment of Testicular Corticosterone Biosynthesis in Adult Male Rats. **PLoS ONE**, v. 10, n. 2, fev. 2015.

MAHMOUD, A. M. et al. The performance of 10 different methods for the estimation of sperm concentration. **Fertility and Sterility**, v. 68, n. 2, p. 340–345, ago. 1997.

MAHMOUD, A. M. et al. Testicular volume in relation to hormonal indices of gonadal function in community-dwelling elderly men. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 88, n. 1, p. 179–184, jan. 2003.

MAKLER, A. A new chamber for rapid sperm count and motility estimation. **Fertility and Sterility**, v. 30, n. 3, p. 313–318, set. 1978.

MAKLER, A. The improved ten-micrometer chamber for rapid sperm count and motility evaluation. **Fertility and Sterility**, v. 33, n. 3, p. 337–338, mar. 1980.

MALIK, S. H.; COULSON, N. The male experience of infertility: a thematic analysis of an online infertility support group bulletin board. **Journal of Reproductive and Infant Psychology**, v. 26, n. 1, p. 18–30, fev. 2008.

MARCHLEWSKA, K. et al. Comparison of the precision in determination of human sperm concentration between an improved Neubauer haematocytometer and Makler counting chamber. **Clinical and Experimental Medical Letters**, v. 51, p. 131–134, 1 jan. 2010.

MATSON, P. et al. Delay in the application of the cover glass is a potential source of error with the Makler Counting Chamber. **Fertility and Sterility**, v. 72, n. 3, p. 559–561, set. 1999.

MAYORGA-TORRES, B. J. M. et al. Are oxidative stress markers associated with unexplained male infertility? **Andrologia**, v. 49, n. 5, jun. 2017.

MCILROY, D. et al. An auxiliary mode of apoptotic DNA fragmentation provided by phagocytes. **Genes & Development**, v. 14, n. 5, p. 549–558, 1 mar. 2000.

MCQUEEN, D. B.; ZHANG, J.; ROBINS, J. C. Sperm DNA fragmentation and recurrent pregnancy loss: a systematic review and meta-analysis. **Fertility and Sterility**, v. 112, n. 1, p. 54–60.e3, 2019.

MEHRPOUR, O. et al. Occupational exposure to pesticides and consequences on male semen and fertility: a review. **Toxicology Letters**, v. 230, n. 2, p. 146–156, out. 2014.

MENKVELD, R. et al. The evaluation of morphological characteristics of human spermatozoa according to stricter criteria. **Human Reproduction (Oxford, England)**, v. 5, n. 5, p. 586–592, jul. 1990.

MILLER, D.; BRINKWORTH, M.; ILES, D. Paternal DNA packaging in spermatozoa: more than the sum of its parts? DNA, histones, protamines and epigenetics. **Reproduction (Cambridge, England)**, v. 139, n. 2, p. 287–301, fev. 2010.

MILLS, M. et al. Why do people postpone parenthood? Reasons and social policy incentives. **Human Reproduction Update**, v. 17, n. 6, p. 848–860, nov. 2011.

MURRAY, L. et al. Association of early life factors and acute lymphoblastic leukaemia in childhood: historical cohort study. **British Journal of Cancer**, v. 86, n. 3, p. 356–361, fev. 2002.

NARGUND, V. H. Effects of psychological stress on male fertility. **Nature Reviews. Urology**, v. 12, n. 7, p. 373–382, jul. 2015.

NEAVES, W. B. et al. Leydig cell numbers, daily sperm production, and serum gonadotropin levels in aging men. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 59, n. 4, p. 756–763, out. 1984.

NETO, F. T. L. et al. Spermatogenesis in humans and its affecting factors. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 59, p. 10–26, nov. 2016.

NIKOOBAKHT, M. R. et al. The role of hypothyroidism in male infertility and erectile dysfunction. **Urology Journal**, v. 9, n. 1, p. 405–409, 2012.

NONAKA, S. et al. Signaling pathway for phagocyte priming upon encounter with apoptotic cells. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 292, n. 19, p. 8059–8072, 12 maio 2017.

NORDKAP, L. et al. Psychological stress and testicular function: a cross-sectional study of 1,215 Danish men. **Fertility and Sterility**, v. 105, n. 1, p. 174–187.e1–2, jan. 2016.

NORDKAP, L. et al. Possible involvement of the glucocorticoid receptor (NR3C1) and selected NR3C1 gene variants in regulation of human testicular function. **Andrology**, v. 5, n. 6, p. 1105–1114, nov. 2017.

NORDKAP, L. et al. Impact of psychological stress measured in three different scales on testis function: A cross-sectional study of 1362 young men. **Andrology**, Online ahead of print. jul. 2020.

OEHNINGER, S.; MORSHEDI, M.; FRANKEN, D. The hemizona assay for assessment of sperm function. **Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)**, v. 927, p. 91–102, 2013.

PAN, F. et al. No evidence of severe acute respiratory syndrome-coronavirus 2 in semen of males recovering from coronavirus disease 2019. **Fertility and Sterility**, v. 113, n. 6, p. 1135–1139, jun. 2020.

PANNER SELVAM, M. K. et al. Etiologies of sperm DNA damage and its impact on male infertility. **Andrologia**, p. e13706, jun. 2020.

PASQUALOTTO, F. F. et al. High percentage of abnormal semen parameters in a prevasectomy population. **Fertility and Sterility**, v. 85, n. 4, p. 954–960, abr. 2006.

PASTUSZAK, A. W.; WANG, R. Varicocele and testicular function. **Asian Journal of Andrology**, v. 17, n. 4, p. 659–667, 2015.

PATEL, A. S.; LEONG, J. Y.; RAMASAMY, R. Prediction of male infertility by the World Health Organization laboratory manual for assessment of semen analysis: A systematic review. **Arab Journal of Urology**, v. 16, n. 1, p. 96–102, nov. 2017.

PEDERSON, E. L.; VOGEL, D. L. Male gender role conflict and willingness to seek counseling: Testing a mediation model on college-aged men. **Journal of Counseling Psychology**, v. 54, n. 4, p. 373–384, 2007.

PENG, N.; ZOU, X.; LI, L. Comparison of different counting chambers using a computer-assisted semen analyzer. **Systems Biology in Reproductive Medicine**, v. 61, n. 5, p. 307–313, 2015.

PERONACE, L. A.; BOIVIN, J.; SCHMIDT, L. Patterns of suffering and social interactions in infertile men: 12 months after unsuccessful treatment. **Journal of Psychosomatic Obstetrics and Gynaecology**, v. 28, n. 2, p. 105–114, jun. 2007.

PETERS, A. J.; ZANEVELD, L. J. D.; JEYENDRAN, R. S. Quality assurance for sperm concentration using latex beads. **Fertility and Sterility**, v. 60, n. 4, p. 702–705, 1 out. 1993.

POURMASUMI, S. et al. Evaluation of Sperm Chromatin Integrity Using Aniline Blue and Toluidine Blue Staining in Infertile and Normozoospermic Men. **Journal of Reproduction & Infertility**, v. 20, n. 2, p. 95–101, 2019.

PUNJABI, U. et al. Fifteen years of Belgian experience with external quality assessment of semen analysis. **Andrology**, v. 4, n. 6, p. 1084–1093, nov. 2016.

QUAAS, A.; DOKRAS, A. Diagnosis and Treatment of Unexplained Infertility. **Reviews in Obstetrics and Gynecology**, v. 1, n. 2, p. 69–76, 2008.

REGIER, D. A. et al. Comorbidity of mental disorders with alcohol and other drug abuse. Results from the Epidemiologic Catchment Area (ECA) Study. **JAMA**, v. 264, n. 19, p. 2511–2518, nov. 1990.

RIBAS-MAYNOU, J. et al. Comprehensive analysis of sperm DNA fragmentation by five different assays: TUNEL assay, SCSA, SCD test and alkaline and neutral Comet assay. **Andrology**, v. 1, n. 5, p. 715–722, set. 2013.

RICCI, E. et al. Semen quality and alcohol intake: a systematic review and meta-analysis. **Reproductive Biomedicine Online**, v. 34, n. 1, p. 38–47, jan. 2017.

RICHARD, J.; BADILLO-AMBERG, I.; ZELKOWITZ, P. “So Much of This Story Could Be Me”: Men’s Use of Support in Online Infertility Discussion Boards. **American Journal of Men’s Health**, v. 11, n. 3, p. 663–673, maio 2017.

RIZZINI, M.; SANTOS, A. M. DOS; SILVA, A. A. M. DA. Evidências de validade do instrumento Eventos de Vida Produtores de Estresse (EVPE). **Rev. Saúde Pública**, v. 52, 7 fev. 2018.

ROSENFELDT, F. et al. Oxidative stress in surgery in an ageing population: pathophysiology and therapy. **Experimental Gerontology**, v. 48, n. 1, p. 45–54, jan. 2013.

SADLER, T. W. **Langman's Medical Embryology**. [s.l.] Wolters Kluwer, 2018.

SAID, T. M.; RANGA, G.; AGARWAL, A. Relationship between semen quality and tobacco chewing in men undergoing infertility evaluation. **Fertility and Sterility**, v. 84, n. 3, p. 649–653, set. 2005.

SAMPLASKI, M. K. et al. Finasteride use in the male infertility population: effects on semen and hormone parameters. **Fertility and Sterility**, v. 100, n. 6, p. 1542–1546, dez. 2013.

SANTI, D.; SPAGGIARI, G.; SIMONI, M. Sperm DNA fragmentation index as a promising predictive tool for male infertility diagnosis and treatment management - meta-analyses. **Reproductive Biomedicine Online**, v. 37, n. 3, p. 315–326, set. 2018.

SCHLATT, S.; EHMCKE, J. Regulation of spermatogenesis: an evolutionary biologist's perspective. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 29, p. 2–16, maio 2014.

SCHMIDT, L. et al. Demographic and medical consequences of the postponement of parenthood. **Human Reproduction Update**, v. 18, n. 1, p. 29–43, jan. 2012.

SCHULTE, R. T. et al. Temporal Decreases in Sperm Motility: Which Patients Should Have Motility Checked at Both 1 and 2 Hours After Collection? **Journal of Andrology**, v. 29, n. 5, p. 558–563, 2008.

SENGUPTA, P. et al. Decline in sperm count in European men during the past 50 years. **Human & Experimental Toxicology**, v. 37, n. 3, p. 247–255, mar. 2018.

SENGUPTA, P.; BANERJEE, R. Environmental toxins: alarming impacts of pesticides on male fertility. **Human & Experimental Toxicology**, v. 33, n. 10, p. 1017–1039, out. 2014.

SHARMA, A.; AHMAD FAROUK, I.; LAL, S. K. COVID-19: A Review on the Novel Coronavirus Disease Evolution, Transmission, Detection, Control and Prevention. **Viruses**, v. 13, n. 2, p. 202, 29 jan. 2021.

SHARPE, R. M. Sperm counts and fertility in men: a rocky road ahead. **EMBO Reports**, v. 13, n. 5, p. 398–403, maio 2012.

SIMON, L.; LEWIS, S. E. M. Sperm DNA damage or progressive motility: which one is the better predictor of fertilization in vitro? **Systems Biology in Reproductive Medicine**, v. 57, n. 3, p. 133–138, jun. 2011.

SINGH, N. P.; MULLER, C. H.; BERGER, R. E. Effects of age on DNA double-strand breaks and apoptosis in human sperm. **Fertility and Sterility**, v. 80, n. 6, p. 1420–1430, dez. 2003.

SINGH, R. et al. Effect of radiofrequency radiation on reproductive health. **The Indian Journal of Medical Research**, v. 148, n. Suppl 1, p. S92–S99, dez. 2018.

SIQUEIRA, S. et al. Changes in seminal parameters among Brazilian men between 1995 and 2018. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 6430, abr. 2020.

SLAMA, R. et al. Time to pregnancy and semen parameters: a cross-sectional study among fertile couples from four European cities. **Human Reproduction (Oxford, England)**, v. 17, n. 2, p. 503–515, fev. 2002.

SMIT, M. et al. Decreased sperm DNA fragmentation after surgical varicocelectomy is associated with increased pregnancy rate. **The Journal of Urology**, v. 183, n. 1, p. 270–274, jan. 2010.

SMITH, J. F. et al. Socioeconomic disparities in the use and success of fertility treatments: analysis of data from a prospective cohort in the United States. **Fertility and Sterility**, v. 96, n. 1, p. 95–101, jul. 2011.

SUN, H. et al. Global, regional, and national prevalence and disability-adjusted life-years for infertility in 195 countries and territories, 1990-2017: results from a global burden of disease study, 2017. **Ageing**, v. 11, n. 23, p. 10952–10991, 2 dez. 2019.

SWAN, S. H.; ELKIN, E. P.; FENSTER, L. The question of declining sperm density revisited: an analysis of 101 studies published 1934-1996. **Environmental Health Perspectives**, v. 108, n. 10, p. 961–966, out. 2000.

TANG, W.-H. et al. Correlation between body mass index and semen quality in male infertility patients. **Turkish Journal of Medical Sciences**, v. 45, n. 6, p. 1300–1305, jan. 2015.

TEJADA, C. A. O. et al. The sociodemographic, behavioral, reproductive, and health factors associated with fertility in Brazil. **PLoS ONE**, v. 12, n. 2, fev. 2017.

THOMÉE, S. Mobile Phone Use and Mental Health. A Review of the Research That Takes a Psychological Perspective on Exposure. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 15, n. 12, p. 2692, 29 nov. 2018.

TSAREV, I. et al. Evaluation of male fertility potential by Toluidine Blue test for sperm chromatin structure assessment. **Human Reproduction**, v. 24, n. 7, p. 1569–1574, 1 jul. 2009.

VAHIDI, S. et al. Effect of Coronavirus Disease (COVID-19) on Human Semen: No Evidence of Coronavirus in Semen of Patients. **BioMed Research International**, v. 2022, p. 6204880, 2022.

VASAN, S. S. Semen analysis and sperm function tests: How much to test? **Indian Journal of Urology : IJU : Journal of the Urological Society of India**, v. 27, n. 1, p. 41–48, 2011.

VELLANI, E. et al. Association of state and trait anxiety to semen quality of in vitro fertilization patients: a controlled study. **Fertility and Sterility**, v. 99, n. 6, p. 1565–1572, maio 2013.

VERZE, P.; CAI, T.; LORENZETTI, S. The role of the prostate in male fertility, health and disease. **Nature Reviews. Urology**, v. 13, n. 7, p. 379–386, jul. 2016.

WALL, J.; JAYASENA, C. N. Diagnosing male infertility. **BMJ (Clinical research ed.)**, v. 363, p. k3202, out. 2018.

WANG, C.; SWERDLOFF, R. S. Limitations of Semen Analysis as a Test of Male Fertility and Anticipated Needs from Newer Tests. **Fertility and sterility**, v. 102, n. 6, p. 1502–1507, dez. 2014.

WANG, Q.-L. et al. Evaluating an external quality assurance program for semen analysis in China during 2009–2020. **Andrology**, v. 10, n. 6, p. 1143–1149, set. 2022.

WDOWIAK, A. et al. Impact of emotional disorders on semen quality in men treated for infertility. **Neuro Endocrinology Letters**, v. 38, n. 1, p. 50–58, fev. 2017.

WDOWIAK, A. et al. Background ionizing radiation and semen parameters of men with reproductive problems. **Annals of agricultural and environmental medicine: AAEM**, v. 27, n. 1, p. 43–48, 17 mar. 2020.

WHO. **WHO laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction**. 3. ed. Cambridge: World Health Organization, 1993.

WHO. **WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen**. 6. ed. Geneva: World Health Organization, HRP, 2021. v. 6

XIE, Y. et al. SARS-CoV-2 effects on sperm parameters: a meta-analysis study. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 39, n. 7, p. 1555–1563, jul. 2022.

YAN, B. et al. A unique role of the DNA fragmentation factor in maintaining genomic stability. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 5, p. 1504–1509, 31 jan. 2006.

YAZAWA, H.; SASAGAWA, I.; NAKADA, T. Apoptosis of testicular germ cells induced by exogenous glucocorticoid in rats. **Human Reproduction**, v. 15, n. 9, p. 1917–1920, set. 2000.

YE, Y.-X. et al. Associations between depression, oxidative stress, and semen quality among 1,000 healthy men screened as potential sperm donors. **Fertility and Sterility**, v. 117, n. 1, p. 86–94, 1 jan. 2022.

ZADEH, A. A.; ARAB, D. COVID-19 and male reproductive system: pathogenic features and possible mechanisms. **Journal of Molecular Histology**, v. 52, n. 5, p. 869–878, out. 2021.

ZEGERS-HOCHSCHILD, F. et al. The International Glossary on Infertility and Fertility Care, 2017. **Fertility and Sterility**, v. 108, n. 3, p. 393–406, set. 2017.

ZHANG, G. et al. Effects of cell phone use on semen parameters: Results from the MARHCS cohort study in Chongqing, China. **Environment International**, v. 91, p. 116–121, maio 2016.

ZHANG, M.-H. et al. Changes in Levels of Seminal Nitric Oxide Synthase, Macrophage Migration Inhibitory Factor, Sperm DNA Integrity and Caspase-3 in Fertile Men after Scrotal Heat Stress. **PloS One**, v. 10, n. 10, p. e0141320, out. 2015.

ZHOU, J. et al. The Semen pH Affects Sperm Motility and Capacitation. **PloS One**, v. 10, n. 7, p. e0132974, 2015.

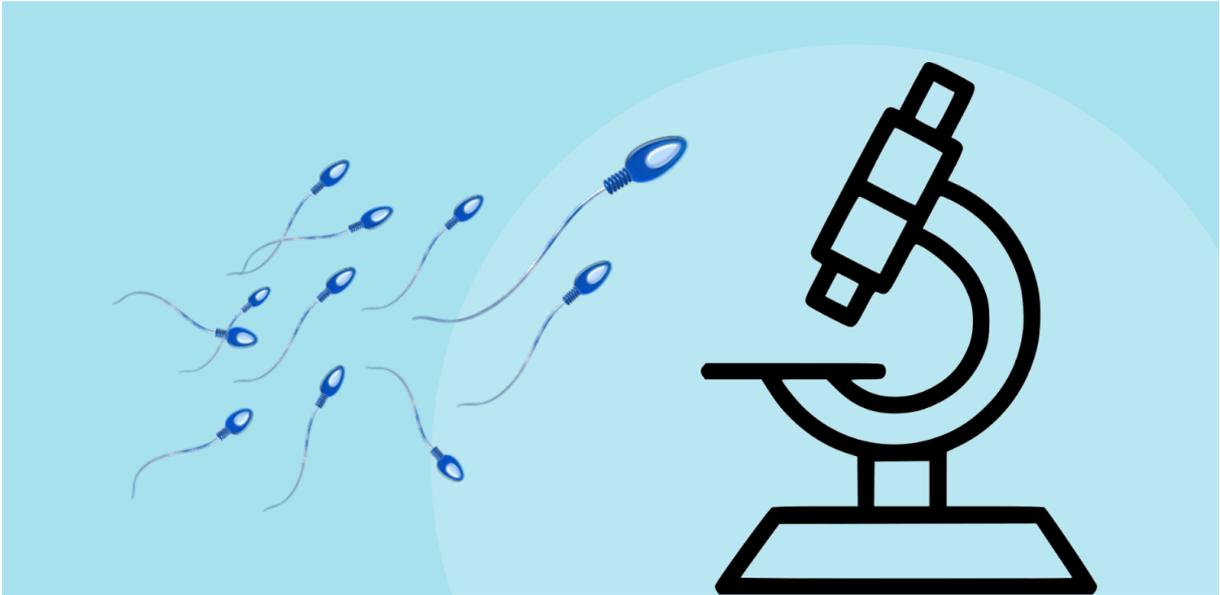
ZHOU, Y. et al. Association between ambient temperature and semen quality: A longitudinal study of 10 802 men in China. **Environment International**, v. 135, p. 105364, fev. 2020.

ZILBERLICHT, A. et al. Habits of cell phone usage and sperm quality - does it warrant attention? **Reproductive Biomedicine Online**, v. 31, n. 3, p. 421–426, set. 2015.

ZOU, P. et al. **Semen Quality in Chinese College Students: Associations With Depression and Physical Activity in a Cross-Sectional Study.** **PSYCHOSOMATIC MEDICINE** TWO COMMERCE SQ, 2001 MARKET ST, PHILADELPHIA, PA 19103 USALIPPINCOTT WILLIAMS & WILKINS, , 2018.

ZOU, Z. et al. Semen quality analysis of military personnel from six geographical areas of the People's Republic of China. **Fertility and Sterility**, v. 95, n. 6, p. 2018–2023, 2023.e1–3, maio 2011.

ZUVELA, E.; MATSON, P. Performance of four chambers to measure sperm concentration: results from an external quality assurance programme. **Reproductive Biomedicine Online**, v. 41, n. 4, p. 671–678, out. 2020.

ANEXO A – CARTAZ DE DIVULGAÇÃO DO PROJETO

VENHA FAZER SEU ESPERMOGRAMA

CONVIDAMOS HOMENS ACIMA DE 18 ANOS PARA PARTICIPAR DO PROJETO DE PESQUISA DE DOUTORADO DO PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS DA UFSC E FAZER A ANÁLISE DO SÊMEN DE FORMA GRATUITA

Nos últimos 50 anos houve um declínio de 50-60% nas contagens de espermatozoides da população masculina. Fatores hormonais, testiculares ou obstrutivos podem levar a infertilidade, porém em cerca de 15% dos casos não há uma causa aparente. Felizmente, mudanças nos hábitos de vida e tratamentos adequados podem melhorar a qualidade do sêmen. Faça o espermograma e avalie sua saúde e a saúde de seus espermatozoides.

Contato

✉ projetoespermogramaufsc@gmail.com

☎ (48) 988659042

LACIT
LABORATÓRIO DE CITOLOGIA CLÍNICA - UFSC

ANEXO B – QUESTIONÁRIO DE DADOS DEMOGRÁFICOS E HÁBITOS DE VIDA

Número do protocolo: _____

Data: _____

Data de nascimento:	Idade:
Peso:	Altura:
Estado civil: () solteiro () casado	
Escolaridade: () não possui () ensino fundamental incompleto () ensino fundamental completo () ensino médio incompleto () ensino médio completo () ensino superior incompleto () ensino superior completo	
Estado do Brasil onde nasceu:	
Estado do Brasil onde mora atualmente:	
Você é fumante? () sim () não	Se fuma, qual o número de cigarros por dia?
Se fuma, teve início com qual idade?	
Você consome bebidas alcoólicas? () sim () não	Se sim, com qual frequência? () 1 vez na semana () 2 vezes na semana () de 3 a 4 vezes na semana () 5 ou mais vezes na semana
Se consome bebidas alcoólicas, teve início em qual idade?	
Com qual frequência você faz uso de celular?	() menos de 5 horas por dia () mais de 5 horas por dia
O celular fica normalmente no bolso da calça? () sim () não	

Com qual frequência você pratica exercícios físicos?	<input type="checkbox"/> Não pratico exercícios físicos <input type="checkbox"/> 1 a 2 vezes por semana <input type="checkbox"/> 3 a 4 vezes por semana <input type="checkbox"/> 5 a 6 vezes por semana <input type="checkbox"/> 7 vezes por semana
Você tem ou teve alguma infecção sexualmente transmissível no último ano? <input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> não	Se sim, qual(is)? <input type="checkbox"/> HIV/AIDS <input type="checkbox"/> sífilis <input type="checkbox"/> clamídia <input type="checkbox"/> herpes <input type="checkbox"/> gonorreia <input type="checkbox"/> hepatite B <input type="checkbox"/> outros _____
Você tem alguma doença crônica? <input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> não	Se sim, qual(is)? <input type="checkbox"/> diabetes <input type="checkbox"/> hipertensão <input type="checkbox"/> asma <input type="checkbox"/> depressão <input type="checkbox"/> colesterol alto <input type="checkbox"/> artrite <input type="checkbox"/> outros _____
Está fazendo uso de algum medicamento? <input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> não	Se sim, qual(is)?
O medicamento é de uso contínuo? <input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> não	
Você já fez alguma cirurgia na região pélvica? <input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> não	
Você trabalha ou faz prática de alguma das seguintes atividades de maneira constante (ao menos duas vezes por semana)? <input type="checkbox"/> Trabalho com agrotóxicos como herbicidas, fungicidas, inseticidas, bactericidas ou acaricidas <input type="checkbox"/> Trabalho com metais pesados, como chumbo, mercúrio, prata, cobre, zinco, etc. <input type="checkbox"/> Trabalho em condições de calor excessivo como cozinheiro, padeiro, fundidor de metais, fabricante de vidro, mineiro, etc. <input type="checkbox"/> Transporte por motocicleta <input type="checkbox"/> Prática de ciclismo <input type="checkbox"/> Não trabalho ou faço prática de nenhuma das atividades acima	
Você já teve câncer? <input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> não	Se sim, qual tipo de câncer?
Você tem algum caso de câncer na família? <input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> não	Se sim, qual tipo de câncer? _____ Grau de parentesco: <input type="checkbox"/> mãe <input type="checkbox"/> pai <input type="checkbox"/> irmão(ã) <input type="checkbox"/> avô(ó)

Você tem filhos? () sim () não	Número de filhos:	Idade do último filho:
--	--------------------------	-------------------------------

Você já passou mais de seis meses tentando ter filhos e não teve sucesso?
() sim () não

Você já se sentiu frustrado por tentar ter filhos e não conseguir?
() sim () não

Já teve relato de problemas de infertilidade na família (avós, pais, tios, irmãos)?
() sim () não

Teve COVID-19? Apenas responda sim se realizou teste em laboratório ou farmácia. () sim () não	Quando? Mês/Ano:
--	-------------------------

Você apresentou sintomas graves ou internações hospitalares por causa da COVID-19?
() sim () não

Você possui algumas das seguintes condições clínicas?

() Varicocele (dilatação das veias que drenam o sangue testicular)

() Criptorquidia (os testículos não descem para a bolsa escrotal)

() Hipospádia (malformação congênita da genitália masculina)

() Obstrução no sistema de ductos que transportam o sêmen

() Não possui nenhuma das condições citadas acima

Os parâmetros do espermograma podem sofrer alterações biológicas normais entre uma coleta e outra. A atividade das glândulas sexuais acessórias e o tempo desde a última atividade sexual podem ser responsáveis por variabilidade entre um mesmo indivíduo. Caso algum de seus parâmetros do espermograma estejam abaixo dos valores de referência você gostaria de ser contactado para uma segunda coleta para confirmação do resultado?

() sim () não

Você acredita ter alguma condição clínica que não foi perguntada no questionário que possa ter relação com sua fertilidade?

ANEXO C – ESCALA DE ESTRESSE PERCEBIDO

Você deve responder as perguntas marcando com um “X” a nota que mais se adequa a sua percepção de estresse no **último mês**. As notas vão de 0 (menos me identifico) a 4 (me identifico completamente).

Neste último mês, com que frequência...		Nunca	Quase nunca	Às vezes	Quase sempre	Sempre
1	Você tem ficado triste por causa de algo que aconteceu inesperadamente?	0	1	2	3	4
2	Você tem se sentido incapaz de controlar as coisas importantes em sua vida?	0	1	2	3	4
3	Você tem se sentido nervoso e “estressado”?	0	1	2	3	4
4	Você tem se sentido confiante na sua habilidade de resolver problemas pessoais?	0	1	2	3	4
5	Você tem sentido que as coisas estão acontecendo de acordo com a sua vontade?	0	1	2	3	4
6	Você tem achado que não conseguiria lidar com todas as coisas que você tem que fazer?	0	1	2	3	4
7	Você tem conseguido controlar as irritações em sua vida?	0	1	2	3	4
8	Você tem sentido que as coisas estão sob o seu controle?	0	1	2	3	4
9	Você tem ficado irritado porque as coisas que acontecem estão fora do seu controle?	0	1	2	3	4
10	Você tem sentido que as dificuldades se acumulam a ponto de você acreditar que não pode superá-las?	0	1	2	3	4

ANEXO D – INVENTÁRIO DE EVENTOS DE VIDA ESTRESSANTES

Você deve responder as perguntas com **SIM** ou **NÃO** para as situações que vivenciou no **último ano**:

Neste último ano...		Sim	Não
1	Você teve algum problema de saúde que o impediu de realizar alguma de suas atividades habituais (trabalho, estudo ou lazer) por mais de um mês?		
2	Você esteve internado em hospital por uma noite, ou mais, em razão de doença ou acidente?		
3	Faleceu algum parente próximo seu (pai, mãe, cônjuge, filho ou irmão)?		
4	Você enfrentou dificuldades financeiras mais severas do que as habituais?		
5	Você foi forçado a mudar de casa contra sua vontade (por exemplo, por aumento de aluguel)?		
6	Você passou por algum rompimento de relação amorosa, incluindo namoro, divórcio ou separação?		
7	Você foi assaltado ou roubado, isto é, teve dinheiro ou algum bem tomado, mediante uso ou ameaça de violência?		
8	Você foi vítima de alguma agressão física?		

ANEXO E – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SANTA CATARINA - UFSC



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação da qualidade de sêmen humano no Brasil utilizando métodos de análise padrão e coadjuvantes

Pesquisador: Alexandre Sherley Casimiro Onofre

Área Temática: Reprodução Humana (pesquisas que se ocupam com o funcionamento do aparelho reprodutor, procriação e fatores que afetam a saúde reprodutiva de humanos, sendo que nessas pesquisas serão considerados "participantes da pesquisa" todos os que forem afetados pelos procedimentos delas):
(Reprodução Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP;);

Versão: 2

CAAE: 19806819.1.0000.0121

Instituição Proponente: Universidade Federal de Santa Catarina

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.707.913

Apresentação do Projeto:

O presente projeto, "Avaliação da qualidade do sêmen humano no Brasil utilizando métodos de análise padrão e coadjuvantes" trata de um projeto de pesquisa envolvendo o Programa de pós-graduação em Ciências Médicas, o Programa de pós-graduação em Farmácia e o curso de graduação em Farmácia da UFSC. Assina a folha de rosto como pesquisador responsável, o pesquisador Alexandre Sherley Casimiro Onofre. Conforme explicado pelos pesquisadores, problemas de fertilidade vem se tornando cada vez mais frequentes entre casais no mundo. Parte desses problemas de fertilidade pode ser atribuído a redução assustadora da qualidade do sêmen ao longo dos anos em países ocidentais. No Brasil, poucos estudos avaliam a qualidade do sêmen, portanto, estudos prospectivos representativos são necessários para confirmar esse declínio na qualidade do sêmen, além de elucidar os possíveis fatores associados a esse fenômeno na população brasileira.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Avaliar a qualidade do sêmen humano no Brasil utilizando métodos padrão, testes rápidos e

Endereço: Universidade Federal de Santa Catarina, Prédio Reitoria II, R: Desembargador Vitor Lima, nº 222, sala 401
Bairro: Trindade **CEP:** 88.040-400
UF: SC **Município:** FLORIANOPOLIS
Telefone: (48)3721-6094 **E-mail:** cep.propesq@contato.ufsc.br

Continuação do Parecer: 3.707.913

coadjuvantes.

Objetivo Secundário:

- Identificar a prevalência de resultados alterados de espermograma na população adulta saudável.
- Comparar os parâmetros espermáticos do sêmen de homens saudáveis e não saudáveis.
- Verificar a eficácia de testes rápidos para a análise de concentração e de motilidade em comparação com o método padrão.
- Avaliar o dano ao DNA dos espermatozoides dessas populações.
- Avaliar o estresse oxidativo no sêmen.
- Identificar a presença de HPV no sêmen dos homens estudados.
- Aplicar questionários epidemiológicos a fim de identificar fatores adicionais que podem contribuir com a redução da qualidade do sêmen nessas populações.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Segundo os autores:

Riscos: Os riscos com essa pesquisa são mínimos, sendo o participante pode se sentir desconfortável ao coletar a amostra de sêmen em um ambiente laboratorial e/ou ao responder alguma pergunta de um questionário epidemiológico.

Benefícios: Este estudo trará benefícios diretos para os participantes, os quais terão informações quanto aos parâmetros do seu sêmen, possibilitando o encaminhamento para profissionais especializados em caso de resultados alterados. O estudo também proporcionará dados representativos da população brasileira, uma vez que os limites de referência estabelecidos pela Organização Mundial da Saúde e utilizados no Brasil são originados de dados da população norte americana e europeia, que não necessariamente representam a realidade do Brasil.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pode contribuir para o conhecimento generalizável sobre o tema.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Adequados

Recomendações:

- Incluir o Dr. Henrique Peres Rocha na equipe da pesquisa na Plataforma Brasil.

Endereço: Universidade Federal de Santa Catarina, Prédio Reitoria II, R: Desembargador Vitor Lima, nº 222, sala 401
Bairro: Trindade **CEP:** 88.040-400
UF: SC **Município:** FLORIANOPOLIS
Telefone: (48)3721-6094 **E-mail:** cep.propesq@contato.ufsc.br

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SANTA CATARINA - UFSC**



Continuação do Parecer: 3.707.913

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

- Considerando que todas as pendências apontadas em parecer anterior foram atendidas, este CEP é de parecer favorável à aprovação da pesquisa.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1418722.pdf	29/10/2019 15:02:28		Aceito
Outros	cartarespostacep.pdf	29/10/2019 15:00:51	Ane Francyne Costa	Aceito
Declaração de Pesquisadores	declaracaodrhenrique.pdf	29/10/2019 14:52:20	Ane Francyne Costa	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	29/10/2019 14:51:58	Ane Francyne Costa	Aceito
Folha de Rosto	folhaderosto.pdf	29/10/2019 14:49:03	Ane Francyne Costa	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Projeto_102_Declaracao_ciencia_da_instituicao.pdf	21/08/2019 13:12:20	Ane Francyne Costa	Aceito
Orçamento	Orcamento.docx	21/08/2019 13:09:38	Ane Francyne Costa	Aceito
Cronograma	Cronograma.docx	21/08/2019 13:09:12	Ane Francyne Costa	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_de_pesquisa.pdf	21/08/2019 13:09:02	Ane Francyne Costa	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: Universidade Federal de Santa Catarina, Prédio Reitoria II, R: Desembargador Vitor Lima, nº 222, sala 401
Bairro: Trindade **CEP:** 88.040-400
UF: SC **Município:** FLORIANOPOLIS
Telefone: (48)3721-6094 **E-mail:** cep.propesq@contato.ufsc.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SANTA CATARINA - UFSC



Continuação do Parecer: 3.707.913

FLORIANOPOLIS, 15 de Novembro de 2019

Assinado por:
Maria Luiza Bazzo
(Coordenador(a))

Endereço: Universidade Federal de Santa Catarina, Prédio Reitoria II, R: Desembargador Vitor Lima, nº 222, sala 401
Bairro: Trindade **CEP:** 88.040-400
UF: SC **Município:** FLORIANOPOLIS
Telefone: (48)3721-6094 **E-mail:** cep.propesq@contato.ufsc.br

ANEXO F – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

O Sr. está sendo convidado como voluntário a participar da pesquisa “Avaliação da qualidade de sêmen humano no Brasil utilizando métodos de análise padrão e coadjuvantes” a ser desenvolvida na Universidade Federal de Santa Catarina sob a responsabilidade do Prof. Dr. Alexandre Sherlley Casimiro Onofre. O motivo que nos levou a este estudo é a preocupação com a redução da qualidade da saúde dos espermatozoides de homens ocidentais ao longo dos últimos anos e nosso objetivo é identificar as características do sêmen de homens de nossa região brasileira. Além disso, pretendemos avaliar testes rápidos comerciais para a identificação de problemas relacionados a parâmetros espermáticos, uma vez que estes têm o potencial de facilitar o acesso e tornar menos custosa a identificação inicial de problemas relacionados a fertilidade masculina. Nesse estudo pretende-se avaliar parâmetros obtidos a partir da análise de seu sêmen utilizando algumas metodologias tais como a visualização microscópica para determinação de concentração, motilidade, vitalidade e morfologia de seus espermatozoides, além da análise de dano ao DNA, estresse oxidativo, presença de HPV e a aplicação de testes rápidos comerciais para análise de parâmetros espermáticos.

Essa pesquisa será realizada com participantes do sexo masculino de fertilidade desconhecida e com homens em investigação de infertilidade conjugal. A coleta de sêmen será realizada no laboratório de análises clínicas do Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina (HU-UFSC). Não participarão da pesquisa homens que declararem possuir alterações genéticas e/ou estruturais do sistema reprodutor masculino que comprometam a produção e/ou ejaculação de sêmen e homens com menos de 18 anos.

Assinando este termo, o Sr. concorda em participar deste estudo que consistirá em coletar uma amostra de sêmen por ejaculação após abstinência sexual de 2 a 7 dias e responder a um questionário auto-aplicado sobre seus hábitos de vida e comportamento sexual. O Sr. fornece acesso ao seu material (amostra de sêmen) e também às informações que estarão no seu prontuário médico, caso seja encaminhado e atendido por um médico que trata da saúde do homem. A sua amostra de sêmen será utilizada para realizar o teste de espermograma, análise de dano ao DNA, análise de estresse oxidativo, presença de HPV e análise por testes rápidos no sêmen. A coleta do material e o preenchimento do questionário terão uma duração de mais ou menos 20 minutos.

Se for identificada alguma alteração em seus parâmetros espermáticos o Sr. receberá um documento de encaminhamento para a especialidade médica de urologia que poderá ser utilizado para agendar sua consulta na unidade básica de saúde (UBS) mais próxima de sua moradia ou em uma clínica de sua preferência.

Os riscos com essa pesquisa são mínimos, sendo que o Sr. pode se sentir desconfortável ao coletar a amostra de sêmen em um ambiente laboratorial e/ou ao responder alguma pergunta do questionário. O Sr. tem a garantia que receberá respostas ou esclarecimentos a todas as suas perguntas sobre os assuntos relacionados à pesquisa, por meio do contato com os pesquisadores. O Sr. não terá nenhuma despesa decorrente desta pesquisa, nem receberá qualquer vantagem financeira e tem a liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento, sem qualquer represália/prejuízo. Os pesquisadores declaram que cumprirão as exigências contidas na Resolução CNS 466/2012 (especialmente nos itens IV.3 e IV.4), que o sigilo/privacidade dos participantes será garantido durante todas as etapas da pesquisa, inclusive na divulgação dos resultados. Os pesquisadores tomarão todas as providências necessárias para manter o sigilo de seus dados e mostrarão apenas os resultados obtidos como um todo, sem revelar seu nome ou qualquer informação relacionada à sua privacidade. Os resultados da pesquisa estarão à sua disposição quando finalizada.

Este termo de consentimento encontra-se impresso em 2 (duas) vias, sendo que uma cópia será arquivada pelo pesquisador responsável e a outra será fornecida a você.

Dúvidas sobre a pesquisa envolvendo princípios éticos poderão ser questionadas diretamente a pesquisadora Ane Francyne Costa ou ao Comitê de Ética em Pesquisa da UFSC localizado no prédio Reitoria II, 4º andar, sala 401, localizado na Rua Desembargador Vitor Lima, nº 222, Trindade, Florianópolis. Telefone para contato: 3721-6094.

Eu, _____, portador do RG/CPF _____, concordo em participar desta pesquisa, bem como com a utilização dos dados coletados, desde que seja mantido o sigilo de minha identificação, conforme normas do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos. A minha participação é voluntária podendo ser suspensa a qualquer momento. Pelo presente consentimento, declaro que fui esclarecido sobre a pesquisa a ser realizada, de forma detalhada, livre de qualquer constrangimento e obrigação, e que recebi uma cópia deste termo, assinada pelos pesquisadores.

Florianópolis, _____ de _____ de _____.

Assinatura do participante

Dr. Alexandre Sherlley Casimiro Onofre
Responsável pela Pesquisa
(48) 3721-3474
e-mail: asonofre@hotmail.com

Me. Ane Francyne Costa
Pesquisadora Participante
(48) 98865-9042
e-mail: projetoespermogramaufsc@gmail.com