Guilherme Jacom Abdulmassih Wood

**Impacto da obesidade e da cirurgia bariátrica na função
erétil, hormônios reprodutivos, função testicular e
fragmentação do DNA espermático**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título de
Doutor em Ciências

Programa de Urologia
Orientador: Dr. Marcello Antonio Signorelli Cocuzza

São Paulo

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Wood, Guilherme Jacom Abdulmassih

Impacto da obesidade e da cirurgia bariátrica na
função erétil, hormônios reprodutivos, função
testicular e fragmentação do DNA espermático /
Guilherme Jacom Abdulmassih Wood. -- São Paulo,
2018.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.

Programa de Urologia.

Orientador: Marcello Antonio Signorelli Cocuzza.

Descritores: 1.Infertilidade masculina
2.Obesidade 3.Cirurgia bariátrica 4.Hormônios
esteroides gonadais 5.Análise do sêmen
6.Fragmentação do DNA

USP/FM/DBD-500/18

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

Dedicatória

Aos meus pais, Emerson e Natalia, pelo apoio e amor incondicional, exemplos de casal, de família e de médicos. Fundações do meu caráter. Sem eles nada disto teria sido possível.

À minha esposa, Maria Clara, pela paixão constante, cumplicidade, compreensão e energia positiva. Sua companhia me faz uma pessoa melhor, sempre.

À minha filha, Maria Isabel, que trouxe luz a todos nós e nos mostrou o sentido e a razão de tudo isto.

Agradecimientos

AGRADECIMENTOS

Aos meus irmãos, Bruno e Larissa, pelo companheirismo e amizade. Presentes em todos os momentos marcantes da minha vida, sempre unidos.

À minha família, mineira, paulista e baiana, pela torcida e vibração em cada conquista.

Ao Dr. Marcello Cocuzza, mentor e amigo, pelos ensinamentos, tempo dispendido, e oportunidades oferecidas. Admiração que só aumentou durante o programa de pós-graduação.

Ao Prof. Dr. Miguel Srougi, cujo caráter e conhecimento estimularam a mim e a tantos outros a ingressar na carreira de urologista. Sua contribuição foi inestimável em minha formação.

Ao Prof. Dr. William Nahas, pelo exemplo de profissionalismo e dedicação à Divisão de Urologia.

Ao Prof. Dr. Marco Aurélio Santo, por acreditar neste projeto desde o princípio, e por ter nos proporcionado completo apoio, sem o qual esta tese não teria sido possível.

Aos companheiros do grupo de infertilidade, Bruno Tiseo e Davi Paluello, pela amizade e trocas de experiência. Juntos somos mais fortes.

Aos amigos da residência de urologia, em especial meus contemporâneos Kleiton Yamaçake, Hiury Andrade, Raphael Kato, Renato Fidelis e Victor Srougi. Anos de convivência intensa que nos fizeram crescer juntos.

À Camila, Henrique e Hamilton, cujo apoio foi essencial para o andamento deste projeto, e que tornaram mais fáceis e animadas as manhãs realizando testes de fragmentação de DNA.

Ao Dr. João Paulo Greco, *fellow* do grupo de infertilidade, pela disponibilidade e atenção.

A todos os funcionários do Centro de Reprodução Humana, pelo suporte durante a realização deste trabalho.

À Dra. Cori Tanrikut, pelo acolhimento e ensinamentos durante meu *fellowship* no *Massachusetts General Hospital* de Boston-EUA.

Ao Prof. Dr. Paulo Serafini e Dr. Eduardo Motta, pela oportunidade e confiança depositada.

Ao Dr. Thiago Nunes, colega e amigo, pelo apoio e parceria.

À Fundação CAPES, pelo auxílio financeiro no programa de doutorado sanduíche no exterior.

A todos os integrantes da Panela dos Frangos, eternos amigos que ajudaram a me moldar como médico.

À Dra. Mariana Camargo e ao Dr. Fabio Vicentini, pelas sugestões e aconselhamentos valiosos durante a banca de qualificação.

Aos pacientes participantes, espero que com os resultados aqui apresentados eu tenha retribuído à altura seu esforço em contribuir com a ciência.

*“A ciência é muito mais que um corpo de
conhecimentos. É uma maneira de pensar.”*

Carl Sagan

CONFLITO DE INTERESSE

Este projeto não apresenta nenhum conflito de interesse.

O desenvolvimento desta pesquisa ocorreu no Laboratório de Andrologia do Centro de Reprodução Humana Governador Mário Covas – Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, de janeiro de 2015 a outubro de 2018.

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3ª ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

Novo Acordo Ortográfico da Língua Portuguesa (Decreto nº 6.583 de 29/09/2008).

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS

LISTA DE SIGLAS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

RESUMO

SUMMARY

1	INTRODUÇÃO.....	2
1.1	Considerações sobre a infertilidade masculina	2
1.2	Considerações sobre a obesidade.....	3
1.2.1	Mecanismos propostos da associação entre obesidade e infertilidade masculina	5
1.2.2	Obesidade e incidência de infertilidade masculina	7
1.2.3	IMC e parâmetros seminais	8
1.2.4	Efeitos da obesidade no perfil de hormônios sexuais	10
1.2.5	Obesidade e disfunção erétil	11
1.2.6	Obesidade e reprodução assistida	12
1.2.7	Impacto da redução do IMC na saúde reprodutiva e função erétil do homem obeso	13
1.3	Considerações sobre a fragmentação do DNA espermático	16
1.4	Justificativa do estudo.....	21
2	OBJETIVOS.....	23
3	MÉTODOS	25
3.1	Desenho do estudo e seleção dos pacientes	25
3.2	Cálculo amostral	26
3.3	Local do estudo e financiamento	27

3.4	Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE).....	28
3.5	Crêterios de exclusão.....	28
3.6	Crêterios de avaliação dos pacientes	29
3.7	Exame físico.....	30
3.8	Análise Seminal	31
3.8.1	Avaliação macroscópica	32
3.8.2	Avaliação Microscópica.....	32
3.9	Avaliação da fragmentação do DNA espermático – Ensaio do cometa alcalino.....	35
3.10	Técnica cirúrgica.....	38
3.11	Análise Estatística.....	39
4	RESULTADOS	42
4.1	Fase 1 – Estudo caso-controle.....	43
4.1.1	Avaliação clínica.....	43
4.1.2	Disfunção erétil.....	46
4.1.3	Avaliação hormonal	46
4.1.4	Análise seminal.....	48
4.1.5	Fragmentação do DNA espermático.....	49
4.1.6	Análises adicionais.....	51
4.2	Fase 2 – Estudo longitudinal.....	53
4.2.1	Cirurgia bariátrica	54
4.2.2	Avaliação clínica.....	54
4.2.3	Disfunção erétil.....	55
4.2.4	Avaliação hormonal	56
4.2.5	Análise seminal.....	57
4.2.6	Fragmentação do DNA espermático.....	59
4.2.7	Análises adicionais.....	60
5	DISCUSSÃO.....	63
6	CONCLUSÕES.....	80

7	ANEXOS.....	82
	Anexo A. Carta de aprovação da CAPPesq.....	82
	Anexo B. Carta de concessão da CAPES – Bolsa para Doutorado Sanduíche no Exterior realizado no <i>Massachusetts General Hospital Fertility Center</i>	84
	Anexo C. Termo de consentimento livre e esclarecido.	86
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	90

LISTA DE ABREVIATURAS

DE	Disfunção erétil
DEXA	Absorciometria de raio-X de dupla energia (do inglês: <i>dual energy X-ray absorptiometry</i>)
DGYR	Derivação gástrica em Y-de-Roux
DNA	Ácido desoxirribonucleico
FIV	Fertilização <i>in vitro</i>
FSH	Hormônio folículo-estimulante
HHG	Eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal
ICSI	Injeção intracitoplasmática de espermatozoides
IFD	Índice de fragmentação de DNA
IIEF	Índice Internacional de Função Erétil (do inglês, <i>International Index of Erectile Function</i>)
IMC	Índice de massa corpórea
IPAQ	Questionário Internacional de Atividade Física (do inglês, <i>International Physical Activity Questionnaire</i>)
LH	Hormônio luteinizante
r	Coeficiente de correlação de Pearson
RA	Reprodução assistida
ROC	Característica de operação do receptor (do inglês, <i>receiver operating characteristic</i>)
ROS	Radicais livres de oxigênio (do inglês: <i>reactive oxygen species</i>)
SCD	Teste de dispersão da cromatina espermática (do inglês, <i>sperm chromatin dispersion</i>)

SCSA	Análise da estrutura da cromatina espermática (do inglês: <i>sperm chromatin structure assay</i>)
SHBG	Globulina ligadora de hormônios sexuais
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
TUNEL	Teste de fragmentação de DNA espermático (do inglês: <i>terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling</i> , sem tradução para o português)

LISTA DE SIGLAS

ASRM	Sociedade Americana de Medicina Reprodutiva (do inglês: <i>American Society for Reproductive Medicine</i>)
CAPPesq	Comissão de Ética para a Análise de Projetos de Pesquisa
EUA	Estados Unidos da América
HCFMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
NIH	<i>National Institutes of Health</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Evolução da concentração seminal e da prevalência da obesidade durante décadas	4
Figura 2 – Mecanismos da associação entre obesidade e infertilidade masculina	12
Figura 3 – Desenho do estudo.....	26
Figura 4 – Orquidômetro de Prader	31
Figura 5 – Ensaio do cometa alcalino.....	37
Figura 6 – Padrões de dispersão do DNA dos espermatozoides no teste cometa alcalino	38
Figura 7 – Organograma da inclusão de pacientes no estudo.....	42
Figura 8 – Distribuição do índice de massa corpórea dos pacientes do grupo obesos	45
Figura 9 – Diagrama de caixa dos valores dos hormônios séricos, divididos por grupos.....	47
Figura 10 – Diagrama de caixa dos valores do índice de fragmentação de DNA, divididos por grupos	50
Figura 11 – Gráficos de dispersão de regressão linear – Fase 1	52
Figura 12 – Diagrama de caixa dos valores de testosterona total e testosterona livre, antes e depois da cirurgia bariátrica, nos pacientes do grupo A1	56
Figura 13 – Diagrama de caixa dos valores de concentração seminal e total de espermatozoides no ejaculado, antes e depois da cirurgia bariátrica, nos pacientes do grupo A1	58
Figura 14 – Gráficos de dispersão de regressão linear – Fase 2	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Dados demográficos da população total, variáveis contínuas.....	43
Tabela 2 – Dados demográficos da população total, variáveis categóricas.....	43
Tabela 3 – Dados demográficos separados por grupo, variáveis contínuas	44
Tabela 4 – Dados demográficos separados por grupo, variáveis categóricas.....	45
Tabela 5 – Comparação do escore IIEF-5 dividido entre os grupos.....	46
Tabela 6 – Comparação dos exames hormonais entre os grupos.....	47
Tabela 7 – Comparação da análise seminal entre os grupos.....	49
Tabela 8 – Comparação do índice de fragmentação de DNA entre os grupos	50
Tabela 9 – Análise multivariada: diferença estimada entre os grupos após ajuste por covariáveis	53
Tabela 10 – Dados demográficos, variação após 6 meses de seguimento. Variáveis contínuas	55
Tabela 11 – Dados demográficos, variação após 6 meses de seguimento. Variáveis categóricas.....	55
Tabela 12 – Escore IIEF-5, variação após 6 meses de seguimento.	56
Tabela 13 – Exames hormonais, variação após 6 meses de seguimento.	57
Tabela 14 – Análise seminal, variação após 6 meses de seguimento.	59
Tabela 15 – Fragmentação de DNA espermático, variação após 6 meses de seguimento.	60

RESUMO

Wood GJA. *Impacto da obesidade e da cirurgia bariátrica na função erétil, hormônios reprodutivos, função testicular e fragmentação do DNA espermático* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2018.

INTRODUÇÃO: A prevalência global da obesidade duplicou desde 1980, alcançando mais de 600 milhões de adultos obesos em 2014. Em paralelo a este aumento, alguns autores relataram uma tendência mundial de declínio da concentração de espermatozoides no ejaculado nas últimas décadas. Consequentemente, surge a hipótese da relação entre esses dois fatos temporais. Dentre todas as formas de tratamento da obesidade, a cirurgia bariátrica é a que apresenta melhores resultados em termos de perda de peso e melhor efetividade a longo-prazo. Há evidências na literatura que sugerem que a obesidade é capaz de alterar os níveis dos hormônios reprodutivos e função erétil. No entanto, seus efeitos sobre os parâmetros seminais clássicos e no índice de fragmentação do DNA espermático (IFD) são pouco estabelecidos. Além disso, o impacto da cirurgia bariátrica sobre estas alterações ainda não foi devidamente esclarecido. **OBJETIVO:** Identificar os efeitos da obesidade sobre a função erétil, hormônios reprodutivos, função testicular e IFD de homens obesos. Adicionalmente, avaliar se a cirurgia bariátrica é capaz de afetar estes mesmos parâmetros. **MÉTODOS:** Este estudo foi organizado em duas fases. Na primeira fase, indivíduos com índice de massa corpórea (IMC) menor que 30 kg/m^2 e fertilidade comprovada foram comparados a pacientes obesos em programação para cirurgia bariátrica, com IMC maior que 35 kg/m^2 . Todos os pacientes foram submetidos a dosagem de hormônios reprodutivos, análise seminal e aferição do IFD pelo método do cometa alcalino. O questionário do Índice Internacional de Função Erétil (IIEF-5) foi aplicado. Na segunda fase, parte dos indivíduos obesos foi submetida à cirurgia bariátrica e todos foram convocados para reavaliação em 6 meses. **RESULTADOS:** Homens obesos apresentam maiores níveis séricos de estradiol, LH e FSH, e menores níveis séricos de testosterona total (TT) quando comparados com homens férteis eutróficos. Além disso, apresentam piores parâmetros seminais, com redução do volume ejaculado, concentração seminal, número total de espermatozoides no ejaculado, motilidade total, motilidade progressiva e percentual de espermatozoides com morfologia normal, e elevação do IFD. Na fase 2, homens obesos submetido a cirurgia bariátrica apresentaram elevação dos valores de FSH, SHBG, TT e testosterona livre (TL), e redução dos níveis de prolactina sérica. Além disso, apresentam queda da concentração seminal e do número total de espermatozoides no ejaculado, e queda na fragmentação do DNA espermático. Controles obesos, por outro lado, não apresentaram alterações nas variáveis estudadas. Além disso, maior intensidade da perda de peso esteve associada com alterações mais importantes do número total de espermatozoides no ejaculado, e dos níveis séricos de TT, TL, SHBG e FSH. **CONCLUSÕES:** A obesidade é capaz de induzir alterações importantes dos hormônios reprodutivos, parâmetros seminais e IFD. A cirurgia bariátrica, entretanto, pode reverter os efeitos deletérios sobre os hormônios reprodutivos e fragmentação do DNA, mas pode trazer piora de parâmetros seminais em 6 meses de seguimento.

Descritores: infertilidade masculina; obesidade; cirurgia bariátrica; hormônios esteroides gonadais; análise do sêmen; fragmentação do DNA.

SUMMARY

Wood GJA. *Impact of obesity and bariatric surgery on erectile function, reproductive hormones, testicular function, and sperm DNA fragmentation* [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2018.

INTRODUCTION: Worldwide obesity prevalence has duplicated since 1980, reaching more than 600 million obese adults in 2014. Parallel to this increase, several authors have reported a global tendency of ejaculated sperm concentration decline in the last decades. Therefore, comes to light the hypothesis that these two temporal trends are related. Among all forms of obesity treatments, the one that reaches the best results and long-term effectiveness is the bariatric surgery. Growing evidence in the literature suggests that obesity is capable of altering reproductive hormones levels and erectile function. Effects on classic semen parameters and DNA fragmentation index (DFI), however, have not been properly established. **OBJECTIVE:** Determine the effects of obesity over erectile function, reproductive hormones, testicular function, and DFI in obese men. Additionally, evaluate if bariatric surgery can also impact those parameters. **METHODS:** This study was divided into two phases. On the first phase, individuals with body mass index (BMI) lower than 30 kg/m² and proven fertility were compared to obese men, with BMI higher than 35 kg/m², waiting to be submitted to bariatric surgery. Reproductive hormones evaluation, semen analysis and evaluation of DFI by the alkaline comet assay were performed in all patients. The International Index of Erectile Function (IIEF-5) was used to assess erectile function. On phase two, part of the obese patients was submitted to bariatric surgery, and all were invited to 6-month reevaluation. **RESULTS:** Obese men have higher blood levels of estradiol, LH and FSH, and lower levels of total testosterone (TT) when compared to eutrophic fertile men. Additionally, they present worse semen parameters, with a reduction in ejaculated volume, sperm concentration, total number of sperm in the ejaculate, total motility, progressive motility, and percentage of normal sperm, and higher sperm DFI. On phase two, obese men submitted to bariatric surgery showed higher FSH, SHBG, TT, and free testosterone (FT) levels, and reduction of blood prolactin levels. Moreover, they exhibited a reduction in sperm concentration and total ejaculated sperm count, and a reduction in sperm DNA fragmentation. Obese controls, however, did not experience changes in the studied variables. Finally, the intensity of weight loss was associated with greater changes in total ejaculated sperm count and in TT, TL, SHBG and FSH blood levels. **CONCLUSIONS:** Obesity can induce important changes in reproductive hormones, semen parameters, and DFI. Bariatric surgery, however, can revert the deleterious effects in reproductive hormones and DFI, but can result in worsening of semen parameters on 6-month follow-up.

Descriptors: infertility, male; obesity; bariatric surgery; gonadal steroid hormones; semen analysis; DNA fragmentation

1. INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 Considerações sobre a infertilidade masculina

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), aproximadamente 80 milhões de pessoas ao redor do mundo apresentam problemas relacionados à infertilidade, atingindo aproximadamente 15% dos casais em idade reprodutiva, independente de suas origens étnicas ou sociais.(1-3) A Sociedade Americana de Medicina Reprodutiva (em inglês: *American Society for Reproductive Medicine* – ASRM), define a infertilidade como uma doença do sistema reprodutor, constatada após um período de doze meses de tentativa de concepção sem sucesso, em que o casal manteve relações sexuais sem a utilização de nenhum método contraceptivo.(4)

Avanços expressivos na compreensão da fisiopatologia e no tratamento das causas de infertilidade foram alcançados desde a primeira concepção por fertilização *in vitro* (FIV), em 1978. Posteriormente, o advento da injeção intracitoplasmática de espermatozoide (ICSI) no oócito, divulgada ao mundo por Palermo et al. em 1992, proporcionou resolução para grande parte das causas de infertilidade masculina, e permitiu que homens considerados previamente inférteis pudessem gerar seus próprios filhos biológicos.(5-7) No entanto, a disseminação da técnica diminuiu o interesse tanto pelo diagnóstico específico de doenças potencialmente curáveis quanto na pesquisa de novas opções reais de tratamentos da infertilidade.(8)

Em 30% dos casais que não conseguem engravidar, o homem é o único responsável pela causa da infertilidade, e causas femininas associadas às masculinas ocorrem em 20% dos casos.(9-12) Sendo assim, pode-se dizer que problemas

masculinos estão presentes em cerca de 50% dos casais inférteis. Uma parcela considerável dos homens que procuram atendimento médico devido a infertilidade não apresentam alterações na investigação básica, sendo incluídos no diagnóstico de infertilidade masculina idiopática e, portanto, sem tratamento específico.(13) A FIV e a ICSI tem sido universalmente utilizada nestes casos, mesmo sabendo-se que doenças potencialmente graves podem ser encontradas em homens inférteis e que sua descoberta ocorre apenas por meio de uma investigação cuidadosa e abrangente.(5) Nesse sentido, a importância da avaliação do homem infértil e a possibilidade de tratamento andrológico visando à restituição da fertilidade têm sido relegadas a segundo plano, em parte, por estratégias financeiras.(14)

1.2 Considerações sobre a obesidade

A prevalência mundial da obesidade duplicou desde 1980, alcançando mais de 600 milhões de adultos obesos em 2014.(15) O desenvolvimento de técnicas industriais para a produção e processamento de alimentos altamente palatáveis e calóricos, intensamente difundidos na mídia e facilmente disponibilizados para a população, associados às ocupações e opções de lazer que favorecem o sedentarismo determina um ciclo vicioso de alta ingestão alimentar e baixo dispêndio calórico resultando em verdadeira “epidemia de obesidade”, além de um considerável aumento dos índices de diabetes mellitus na população.(16, 17) Em paralelo a este aumento, alguns autores relataram uma tendência mundial de declínio da concentração de espermatozoides no ejaculado nas últimas décadas.(18-23) Consequentemente, surge a hipótese de que ambas estejam relacionadas (Figura 1).

Figura 1 – Evolução da concentração seminal e da prevalência da obesidade durante décadas

NOTA: A – Diagrama de dispersão da concentração seminal através dos anos. Cada círculo representa média de concentração seminal em um artigo científico, e seu tamanho representa o tamanho da amostra. Adaptado de Johnson et al., 2015.(23) B – Prevalência de sobrepeso e obesidade ajustada por idade, idade ≥ 20 anos, divididos por sexo, 1980-2013. Adaptado de Ng et al., 2014.(15) Ambos reutilizados após permissão do *Copyright Clearance Center*.

Os efeitos da obesidade na infertilidade feminina são extensamente documentados na literatura.(24) Mulheres obesas são mais propensas a apresentar ciclos menstruais irregulares ou anovulatórios devido a alterações do perfil dos hormônios hipofisários e gonadais. Embriões provenientes de mulheres obesas são

de pior qualidade, e taxas de sucesso de técnicas de reprodução assistida (RA) são inversamente relacionadas ao índice de massa corpórea (IMC) feminino. Por outro lado, a associação entre obesidade e infertilidade masculina ainda não foi completamente esclarecida.

1.2.1 Mecanismos propostos da associação entre obesidade e infertilidade masculina

Atividade aumentada da aromatase

A aromatase é uma enzima presente no tecido adiposo e é responsável pela conversão de androgênios em estrógeno. A maior quantidade de tecido adiposo nos pacientes obesos pode resultar em redução nos níveis de testosterona total e da relação testosterona/estradiol pelo aumento da biodisponibilidade da aromatase. Taxas elevadas de estrogênio sérico mostraram-se deletérias à espermatogênese em modelos animais, e podem contribuir para a redução dos níveis de testosterona devido à interação com receptores estrogênicos no hipotálamo. Além disso, interferem na liberação central pulsátil de GnRH, afetando o eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal (HHG).(25) A utilização de inibidores da aromatase como forma de tratamento em pacientes inférteis que apresentam relação testosterona/estradiol diminuída resulta em melhora dos parâmetros seminais.(26)

Leptina

A leptina, hormônio produzido pelo tecido adiposo e codificado pelo gene *ob*, funciona como um sistema mensageiro entre tecido adiposo e neurônios, estimulando a sensação de saciedade no organismo humano.(27) A leptina está cronicamente

elevada em pacientes obesos, e recentemente diversos autores identificaram ações diretas da leptina sobre o sistema reprodutor, pela presença de receptores de leptina no tecido testicular e na membrana plasmática do espermatozoide, e pela detecção de leptina no sêmen.(28-30) Aparentemente os níveis de leptina plasmática tem correlação negativa com os de testosterona devido à ação da leptina sobre receptores nas células de Leydig, com efeito de feedback negativo.(30) Adicionalmente, observou-se que a reposição de testosterona diminui a concentração de leptina plasmática.(31)

Secreção aumentada de insulina e resistência insulínica

Altas taxas de insulina circulante podem inibir a síntese da globulina ligadora de hormônios sexuais (SHBG) pelo fígado resultando em menor quantidade de estrogênio circulante ligado a proteínas. Nestas circunstâncias, uma maior quantidade de estrogênio livre e biologicamente ativo dificulta a homeostase da testosterona livre realizada pela SHBG.(32, 33)

Desregulação do eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal

As alterações já citadas, acrescentadas de concentrações plasmáticas alteradas de glicocorticoides, alteram os mecanismos de feedback do eixo HHG, afetando a espermatogênese. Ao contrário de pacientes com peso normal, baixos níveis de testosterona em pacientes obesos não levam à elevação compensatória esperada dos níveis de FSH e LH, prejudicando ainda mais a função das células de Leydig e Sertoli.(34) A alta prevalência de apneia do sono em pacientes obesos também pode contribuir para a menor elevação noturna dos níveis de testosterona e LH destes indivíduos.(35)

Mecanismos físicos

A elevação da temperatura escrotal, mesmo em moderada elevação fisiológica, pode resultar na piora dos parâmetros seminais.(36) Além da concentração aumentada de gordura na parte superior das coxas, região inguinal e supra púbica de pacientes obesos, a elevada prevalência de sedentarismo nesses pacientes pode contribuir para esse aumento de temperatura e interferir na qualidade seminal.(37)

1.2.2 Obesidade e incidência de infertilidade masculina

Três grandes estudos epidemiológicos sugerem risco elevado para infertilidade conjugal quando o parceiro é obeso ou portador de sobrepeso. Em 2005 Sallmén et al., em uma grande coorte de pacientes norte-americanos, identificaram que aumento de somente 3 pontos do IMC do parceiro em relação a indivíduos com IMC entre 20 e 22kg/m² estava associado com infertilidade, sugerindo que o sobrepeso por si só é capaz de influir na fertilidade masculina.(38) Além disso, mostrou que pacientes nas maiores categorias de IMC do estudo (32 a 34 e acima de 35kg/m²) apresentavam razão de chance para infertilidade de 2,13 e 1,83, respectivamente, quando comparados com indivíduos de IMC normal, e inferiram que o efeito negativo da obesidade sobre a infertilidade masculina é maior com o aumento da gravidade do excesso de peso. Em 2007, estudo em indivíduos de uma coorte norueguesa composta por quase 24 mil homens publicada por Nguyen et al. encontrou resultados similares, com razão de chance para infertilidade de 1,2 e de 1,36 para pacientes com sobrepeso e obesos, respectivamente, também sugerindo efeito progressivo de acordo com a intensidade da obesidade.(39) Ambos os estudos

ajustaram os resultados para a frequência de relações sexuais, mantendo os resultados obtidos inicialmente, e sugerindo que eventual disfunção sexual presente nos pacientes obesos não foi o fator determinante para causar infertilidade. Por fim, resultados provenientes de uma coorte dinamarquesa de 2007 sugerem a mesma associação, com razão de chance para infertilidade de 1,19 entre homens obesos e homens de peso normal.(40) Neste mesmo estudo foi também avaliada a relação entre infertilidade e obesidade feminina, com razão de chance um pouco superior à masculina, de 1,32.

1.2.3 IMC e parâmetros seminais

A relação entre IMC e parâmetros seminais é controversa. Enquanto alguns autores demonstraram correlação inversa entre IMC e concentração seminal ou contagem total de espermatozoides, outros falharam em comprovar essa associação.(33, 41-43) Em 2004, dados de uma coorte dinamarquesa composta de pacientes jovens do sexo masculino mostraram que indivíduos com IMC acima de 25kg/m^2 apresentam concentração espermática 21,6% inferior àquela de pacientes com IMC normal.(33) Estudo caso-controle de 2010 incluindo 2.157 pacientes encontrou correlação negativa entre IMC e contagem total de espermatozoides nos pacientes entre 20 e 30 anos, com coeficiente de correlação de Pearson (r) de $-0,102$.(43) Nenhum dos dois estudos associou obesidade à redução na motilidade ou na morfologia dos espermatozoides.

Por outro lado, em 2008, estudo dinamarquês composto de pacientes provenientes de cinco coortes populacionais diferentes totalizando 2.139 homens não encontrou diferenças entre os parâmetros seminais de obesos e não-obesos.(41)

Adicionalmente, Duits et al., em 2010, não encontraram influência de sobrepeso e obesidade sobre a qualidade seminal de pacientes subfêrteis de um centro de reprodução holandês.(42)

Duas metanálises recentes apresentaram resultados contraditórios a esta questão. Em 2010 revisão sistemática de Macdonald et al., compreendendo resultados de 5 trabalhos, falhou em demonstrar relação direta entre parâmetros seminais e obesidade.(44) Sermondade et al., em 2012, compilaram dados de mais de 13.000 homens provenientes de 20 estudos, e concluiu que sobrepeso e obesidade estão associados a risco elevado para oligospermia e azoospermia quando comparados a pacientes com peso normal.(45) No entanto, ambos os trabalhos apresentam significativas limitações, já que incluíram estudos com metodologias e populações diferentes.

Adicionalmente, alguns estudos tentaram identificar a associação entre IMC e índice de fragmentação do ácido desoxirribonucleico (DNA) espermático (IFD). Estudo de 2006 com 520 pacientes saudáveis mostrou correlação positiva entre IMC e IFD.(46) Neste estudo, enquanto indivíduos com IMC normal apresentaram IFD de 19,9%, aqueles portadores de sobrepeso e obesos apresentaram IFD de 25,8% e 27%, respectivamente, com significância estatística. Estudo transversal de 2011, publicado por Fariello et al. e composto de 305 pacientes provenientes de centro de medicina reprodutiva brasileiro, identificou maior porcentagem de espermatozoides com DNA fragmentado e de espermatozoides com baixa ou zero atividade mitocondrial em pacientes obesos quando comparados com pacientes eutróficos.(47) Por outro lado, Bandel et al., em 2014, não encontraram IFD aumentado em pacientes obesos provenientes de 4 coortes populacionais europeias.(48) Metanálise publicada por Campbell et al. em 2015 concluiu que o IFD está elevado em pacientes obesos,

mesmo incluindo trabalhos que utilizaram técnicas diferentes para a avaliação da fragmentação do DNA.(49)

1.2.4 Efeitos da obesidade no perfil de hormônios sexuais

Uma grande coorte europeia com foco no envelhecimento masculino (em inglês: *European Male Aging Study* – EMAS) identificou níveis séricos reduzidos de testosterona total, testosterona livre e SHBG nos pacientes com sobrepeso e obesos quando comparados com pacientes de peso normal (redução de 5,09 nmol/L, 53,72 pmol/L e 12,01 nmol/L, respectivamente, nos pacientes obesos).(50) Jensen et al. encontraram resultados semelhantes em jovens dinamarqueses, com redução significativa de testosterona total, SHBG e inibina B e elevação de estradiol com o aumento do IMC.(33) Aggerholm et al., em 2008, analisando dados de 5 coortes com aproximadamente mil pacientes, encontraram níveis mais baixos de inibina B, testosterona total e SHBG em pacientes obesos, quando comparados com pacientes de IMC normal.(41) A concentração de estradiol foi maior nos pacientes obesos, mas não estatisticamente significante; FSH e LH também não apresentaram diferença significativa entre os grupos.

Metanálise de 2010 encontrou fortes evidências estatísticas de relação negativa entre IMC e testosterona total e SHBG, e uma provável correlação negativa mais fraca entre testosterona livre e IMC.(44) Os autores sugeriram que a redução da testosterona total pode ser compensada pelo organismo com associada redução dos níveis de SHBG, resultando em menor variação dos níveis de testosterona livre. Além disso, concluíram que a pequena redução nos níveis de testosterona livre tem pouco efeito biológico, corroborando com os achados deste mesmo estudo que não

identificaram alterações dos parâmetros seminais dos pacientes obesos. Entretanto, o esperado aumento dos níveis de estradiol em pacientes portadores de obesidade, devido a conversão periférica de androgênios em estrógeno no tecido adiposo, não foi comprovado. A maioria dos estudos incluídos nesta metanálise não identificou correlação positiva estatisticamente significativa.

1.2.5 Obesidade e disfunção erétil

Obesidade está associada a elevadas taxas de disfunção erétil (DE).(51) Em trabalho baseado nos dados provenientes da coorte prospectiva MMAS (Em inglês: *Massachusetts Male Aging Study*), a incidência de DE em pacientes acima do peso (IMC maior que 28kg/m²) foi significativamente maior que a incidência em pacientes sem sobrepeso (22% e 13%, respectivamente), com razão de chance para DE de 1,96.(52) Dados provenientes de uma grande coorte prospectiva norte-americana, composta de pacientes de todos os estados americanos e com 14 anos de seguimento no momento da publicação do estudo, identificaram risco relativo para DE de 1,5 para homens no maior quintil de IMC (maior que 28,6 kg/m²), quando comparados com pacientes do menor quintil (menor que 23,2kg/m²).(53) Por outro lado, em estudo populacional de corte transversal chinês, apenas pacientes que não praticavam exercício físico apresentavam correlação positiva entre prevalência de DE e IMC.(54)

Mecanismos da associação entre obesidade e infertilidade estão resumidos na Figura 2.

Figura 2 – Mecanismos da associação entre obesidade e infertilidade masculina

NOTA: ROS – Espécies reativas de oxigênio; HHG – Hipotalâmico-hipofisário-gonadal.

1.2.6 Obesidade e reprodução assistida

Recentemente, alguns estudos mostraram que a obesidade masculina está independentemente relacionada a menores taxas de sucesso em técnicas de RA. Em estudo em 115 ciclos de FIV e ICSI de um centro de medicina reprodutiva norte-americano, IMC maior que 25kg/m^2 foi negativamente associado a taxas de sucesso em ciclos de FIV, com razão de chance de 0,21.(55) Os resultados foram ajustados para o IMC da parceira. Não houve diferenças nos ciclos de ICSI, sugerindo que as eventuais alterações presentes nos espermatozoides dos pacientes obesos podem ser superadas por esta técnica. Adicionalmente, em 2010 artigo publicado por Bakos et

al. demonstrou que aumento do IMC paterno em casais submetidos a RA está associado a piora de diversos parâmetros, incluindo redução do desenvolvimento do blastocisto, piores taxas de gravidez clínica, redução dos números de nascidos-vivos, e aumento do risco de abortamento.(56)

Por fim, revisão sistemática de 2015 publicada por Campbell et al. sugere que: 1) a maioria dos trabalhos não encontrou diferenças entre a qualidade embrionária em casais com parceiros obesos e não-obesos; 2) há uma redução nas taxas de gravidez clínica em parceiros obesos, mas sem poder estatístico suficiente neste momento; 3) a taxa de nascidos-vivos é menor nos casais em que o parceiro é obeso, com razão de chance de 0,65.(49)

1.2.7 Impacto da redução do IMC na saúde reprodutiva e função erétil do homem obeso

Alguns estudos mostraram que a perda de peso é capaz de reverter algumas das alterações citadas promovidas pela obesidade sobre a saúde reprodutiva masculina, estabelecendo relação causal mais bem definida. Niskanen et al. em 2004 encontraram aumento dos níveis de testosterona livre e SHBG em homens obesos submetidos a rápida perda de peso sustentada.(57) Em 2011, Hakonsen et al. publicaram artigo mostrando resultados de um programa residencial de perda de peso aplicado sobre 43 pacientes com IMC maior que 33kg/m^2 .(58) Após 14 semanas, perda de peso foi significativamente associada à melhora da contagem de espermatozoides e morfologia, elevação da testosterona, SHBG e hormônio antimülleriano, principalmente no subgrupo com maior perda de peso. Níveis de estradiol e IFD permaneceram inalterados durante o seguimento. Interessante notar

que, ao final deste estudo, o qual era composto de indivíduos extremamente obesos (mediana do IMC de 44kg/m^2), mesmo os pacientes que permaneceram obesos ou com sobrepeso apresentaram alterações benéficas em alguns dos parâmetros estudados. Por outro lado, o fato de que não houve melhora do IFD sugere que este pode ser mais sensível às injúrias decorrentes da obesidade, e que seria necessária maior intensidade de perda de peso para que este seja revertido a valores normais. Em 2004, Esposito et al., em um ensaio clínico randomizado composto por 110 pacientes obesos portadores de DE, mostraram que um terço dos pacientes submetidos a um programa com foco na perda de peso e melhora dos hábitos de vida foi capaz de melhorar sua função sexual.(59)

Dentre todas as formas de tratamento da obesidade, a cirurgia bariátrica é a que apresenta melhores resultados em termos de perda de peso e melhor efetividade a longo-prazo, e deve ser considerada como opção terapêutica em pacientes com IMC acima de 40kg/m^2 ou em pacientes com IMC acima de 35kg/m^2 com comorbidades sérias causadas pela obesidade.(60-62) O tratamento cirúrgico mostrou-se eficiente em reduzir não somente o peso dos pacientes, mas também comorbidades e taxa de mortalidade geral.(63, 64) Em relação a seus efeitos na fertilidade e sexualidade masculina, estudos sugerem que a cirurgia bariátrica pode melhorar o perfil hormonal dos paciente obesos, aumentar índices de satisfação com a vida sexual, e corrigir alterações nos parâmetros seminais.(65-69) Em estudo tailandês publicado em 2016, os autores foram capazes de identificar elevação dos níveis de testosterona total e SHBG já no primeiro mês após a cirurgia, sugerindo que estas alterações estão mais ligadas à melhora da resistência insulínica do que à perda de peso em si.(70) Aumento dos níveis séricos de testosterona livre também foram detectados, após a avaliação realizada 6 meses depois da cirurgia. Também em 2016, estudo

prospectivo com 46 pacientes submetidos a gastrectomia vertical laparoscópica mostrou melhora dos níveis de testosterona total um ano após a cirurgia bariátrica.(69)

Entretanto, o efeito da cirurgia bariátrica sobre os parâmetros seminais permanece controverso. Duas séries de caso totalizando 9 pacientes detectaram intensa alteração do espermograma de pacientes submetidos a cirurgia bariátrica.(71, 72) Destes, oito foram submetidos a derivação gástrica em Y-de-Roux (DGYR), e somente um dos pacientes foi submetido a gastrectomia vertical. Seis pacientes que se apresentaram azoospermicos no pós-operatório tinham sido capazes de estabelecer gestação antes do procedimento, sugerindo relação causal entre a cirurgia e a alteração seminal. Em 2012, no estudo de seguimento mais longo até o momento, não houve alteração seminal decorrente da cirurgia bariátrica após randomização de 20 pacientes para cirurgia ou para acompanhamento clínico, em 2 anos de acompanhamento.(73) Por outro lado, estudo não-randomizado de Samavat et al. publicado em 2017 encontrou correlação positiva entre perda de peso e parâmetros seminais, com tendência de melhora da concentração seminal e total de espermatozoides ejaculados 6 meses após cirurgia bariátrica.(74) Adicionalmente, El Bardisi et al. encontraram elevação da concentração seminal em pacientes azoospermicos e oligospermicos submetidos a cirurgia bariátrica.(69)

Até o momento, o único estudo que avaliou variação da fragmentação do DNA espermático após cirurgia bariátrica foi o estudo de Samavat et al. Neste estudo não foram encontradas diferenças entre o IFD no pré e no pós-operatório dos pacientes.(74)

Revisão sistemática publicada em 2018, compilando dados de 3 estudos, concluiu que a cirurgia bariátrica não tem efeitos sobre parâmetros seminais.(75) No

entanto, o limitado número de pacientes incluído no estudo dificulta a validação dos resultados.

1.3 Considerações sobre a fragmentação do DNA espermático

A análise seminal é peça fundamental da avaliação do paciente infértil, e ajuda a definir a gravidade do fator masculino.(12) No entanto, a grande interposição de valores dos parâmetros seminais de pacientes férteis e inférteis limita a capacidade diagnóstica do exame. Estima-se que até 40% dos pacientes inférteis podem apresentar valores considerados normais pelas diretrizes da Organização Mundial de Saúde (OMS) na análise seminal, e aproximadamente 25% dos homens com análise seminal normal não conseguem engravidar suas parceiras, impulsionando a busca por novos parâmetros com melhor potencial discriminatório.(76-79)

Avanços consideráveis na compreensão do processo reprodutivo masculino nos aspectos biológico, molecular e genético na última década ressaltaram a importância do conhecimento da fisiologia do espermatozoide e da compreensão do mecanismo de fertilização, culminando com a introdução de marcadores bioquímicos de função espermática.(80-82) Defeitos na função espermática são responsáveis por aproximadamente 20% das causas de infertilidade masculina, envolvendo uma extensa gama de alterações das funções como movimento anormal do flagelo, falha no reconhecimento da zona pelúcida e inibição da fusão do espermatozoide com o oócito.(83-88) A introdução de novos biomarcadores de função espermática na prática clínica possibilita uma avaliação mais precisa da etiologia da disfunção do espermatozoide, contribuindo para o correto diagnóstico dos casos classificados como idiopáticos. Além disso, marcadores de função espermática podem ser

utilizados como fatores prognósticos das taxas de gravidez, tanto espontânea quanto por meio dos métodos de RA. Nesse sentido, foram descritos alguns testes nos últimos anos, incluindo reação acrossômica, penetração espermática e hemizona, níveis de creatina quinase, radicais livres de oxigênio, citocinas como a interleucina 6, capacidade antioxidante total, peroxidação lipídica e teste de fragmentação DNA.(89-97)

Nível aumentado de radicais livres de oxigênio (ROS) também tem sido demonstrado no sêmen de 25% a 40% dos homens inférteis.(98, 99) Os efeitos danosos das altas concentrações de oxigênio são atribuídos à formação de ROS.(100) O metabolismo aeróbico normal está relacionado ao nível ideal de radicais livres que depende do equilíbrio entre os processos de produção e de eliminação desses radicais. Em condições normais, o espermatozoide produz pequenas quantidades de radicais livres necessários à realização de processos fisiológicos normais, como a capacitação, reação acrossômica e fusão do espermatozoide com o óvulo.(101, 102) Esses radicais livres gerados são continuamente neutralizados por meio de mecanismos de defesa, sendo o principal deles mediado pelos antioxidantes presentes no plasma seminal.(103)

Entretanto, quando ocorre um aumento na produção de radicais livres ou uma insuficiente neutralização pelos antioxidantes, institui-se uma situação denominada estresse oxidativo.(83, 98) Aparentemente, o desequilíbrio entre ROS e antioxidantes é principalmente secundário ao aumento da produção de ROS, sendo dificilmente causado pela diminuição da capacidade antioxidativa seminal.(83)

O estresse oxidativo produz um dano extenso nas proteínas e modificações no citoesqueleto, além de inibir mecanismos celulares.(104) Além disso, causa alterações importantes na motilidade dos espermatozoides por danos peroxidativos

dos radicais livres à membrana plasmática.(105) A membrana plasmática dos espermatozoides é extremamente sensível aos ROS pela sua composição rica em ácidos graxos poli-insaturados.

Uma das principais consequências do estresse oxidativo é o dano à integridade do DNA do núcleo e ao DNA mitocondrial. O DNA da mitocôndria parece ser mais sensível ao dano oxidativo que o DNA nuclear por não possuir histonas, que exercem um papel protetor no DNA nuclear, e também por apresentar pobre atividade reparadora da DNA polimerase mitocondrial em relação à nuclear.(106) O processo de fertilização em humanos, assim como o desenvolvimento embrionário, depende da integridade do DNA dos espermatozoides.(107) Diferente da estrutura da cromatina das células somáticas, a cromatina espermática é extremamente compactada. Sendo assim, nos últimos estágios da espermatogênese, as histonas são trocadas por proteínas de transição e depois por protaminas.(108) As ligações inter e intramoleculares entre as protaminas ricas em cisteína com pontes dissulfídicas permitem uma compactação e estabilização ainda maior do núcleo espermático, protegendo o DNA espermático de fatores externos. A etiologia do dano ao DNA espermático é multifatorial e pode ocorrer como consequência a fatores intrínsecos ou extrínsecos. Os defeitos intrínsecos que predisõem ao dano do DNA incluem a deficiência de protamina, mutações que afetam adversamente a compactação do DNA, ou outros defeitos do empacotamento.(109) Espermatozoides que iniciam o processo de apoptose e posteriormente interrompem esse ciclo apresentam um maior dano ao DNA.(110) Esse mecanismo é semelhante ao que ocorre com o envelhecimento do homem.(111)

Elevação dos níveis de ROS no sêmen é detectada em um a cada quatro homens com diagnóstico de infertilidade, existindo uma associação entre esse

aumento e as alterações da estrutura do DNA do espermatozoide.(112) Fatores externos como o calor, agentes quimioterápicos, radiação e outras gonadotoxinas estão associados com um aumento na quantidade de espermatozoides ejaculados com dano do DNA.(113) De maneira semelhante, infecções do trato reprodutivo, a presença de varicocele, disfunções hormonais e o tabagismo foram previamente relacionados com aumento do dano ao DNA dos espermatozoides, tanto em modelos experimentais, como em humanos.(114-118) O dano ao DNA espermático não necessariamente impede a fertilização. Sabe-se que o oócito tem capacidade limitada de reparar DNA danificado, mas níveis de fragmentação de DNA acima de um limite pode resultar em aumento das taxas de abortamento espontâneo e falha embrionária.(119, 120)

A análise da fragmentação do DNA do espermatozoide através da susceptibilidade da cromatina (teste SCSA) é capaz de fornecer um índice de fragmentação de DNA que se relaciona negativamente com a fertilidade dos pacientes, além de prever o potencial para FIV.(121) Estudos mostraram a relação da fragmentação do DNA com perda de embrião no primeiro trimestre após FIV, apesar de alguns trabalhos não mostrarem diminuição na taxa de sucesso de técnicas de RA. (122-124) Acredita-se que a fragmentação do DNA do espermatozoide deve estar envolvida na alteração do desenvolvimento do embrião e levando a uma menor taxa de evolução dos fetos, apesar do real mecanismo envolvido neste processo não estar totalmente esclarecido.(125) De forma ainda mais grave, a fragmentação de DNA espermático pode estar relacionada à saúde da prole dos indivíduos, aumentando taxas de malformações e de prevalência de câncer na infância dos filhos de homens com alta fragmentação de DNA.(126)

Atualmente existem 4 métodos para análise da fragmentação do DNA do espermatozoide. A avaliação através do ensaio TUNEL (em inglês: *terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling*) baseia-se na identificação de quebras na fita de DNA através de inserção de nucleotídeos marcados nestas pontas livres pelo uso de uma enzima chamada TdT transferase e posterior quantificação destes nucleotídeos marcados.(127) No método SCSA (em inglês: *Sperm Chromatin Structure Assay*) avalia-se a susceptibilidade da cromatina a ação de solução ácida. Utiliza-se o corante laranja de acridina que marca DNA dupla fita de verde e DNA fita simples em vermelho. Após a exposição a uma solução ácida, o material é corado e levado para avaliação em citômetro de fluxo onde a proporção entre as duas emissões de luz, verde e vermelho, é avaliada.(128) No método de dispersão da cromatina espermática (em inglês: *Sperm Chromatin Dispersion* – SCD) avalia-se, igualmente ao SCSA, a susceptibilidade da cromatina a solução ácida, porém classifica-se a fragmentação do DNA através da análise da dispersão do halo em gelatina ágar-ágar com marcador fluorescente, necessitando apenas de microscópio de campo claro.(129) Já a análise através do ensaio do cometa baseia-se na avaliação individual de células em eletroforese em gel após a quebra da célula em solução salina e detergente. Células com alto grau de fragmentação do DNA apresentam maior dispersão na eletroforese. As células são coradas com corante fluorescentes e avaliadas em microscópio de fluorescência podendo também serem obtidas imagens e estas serem avaliadas por programas automatizados que diminuem a interferência e erros humanos na classificação da dispersão do DNA.(130)

Estudos recentes compararam as análises de fragmentação de DNA do espermatozoide em relação a sua capacidade de predizer a fertilidade do indivíduo. Alguns autores mostraram que as análises com TUNEL, SCSA, SCD e cometa são

capazes de diferenciar pacientes férteis de inférteis.(131-133) Atualmente a avaliação através de SCSA é a mais utilizada e com maior normatização entre laboratórios clínicos e experimentais, provavelmente por ser a mais antiga das técnicas descritas. Entretanto, necessita de análise com citômetro de fluxo e tem custo mais elevado.(134) A análise por meio do cometa compara-se ao SCSA e ao TUNEL na capacidade de correlação com potencial de fertilidade, apresenta custo inferior, não necessita de citômetro de fluxo e tem maior acurácia em definir a fertilidade do indivíduo que todos os outros testes.(132, 135) Ribas-Maynou J *et al.* demonstraram que o cometa realizado em meio alcalino possui a maior área sob a curva ROC comparado com os outros testes tendo assim um maior valor preditivo positivo e negativo em relação a fertilidade.(125) Deste modo, decidimos pelo uso desta técnica em nosso estudo.

1.4 Justificativa do estudo

O real impacto da obesidade sobre a função erétil, hormônios reprodutivos, função testicular, parâmetros seminais, e nível de fragmentação de DNA no sêmen ainda não foi completamente esclarecido. Além disso, apesar de existir um consenso de que a cirurgia bariátrica resulta em inúmeros benefícios à saúde do homem com obesidade, seus efeitos sobre a função erétil, hormonal e gonadal não foram devidamente estudados. Esse conhecimento pode possibilitar uma melhor orientação dos pacientes obesos candidatos à cirurgia bariátrica, principalmente àqueles que não apresentam alteração dos parâmetros seminais, ou quando seu potencial de fertilidade ainda não foi devidamente testado.

2. OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

1. Avaliar o impacto da obesidade em homens na função erétil, hormônios reprodutivos, função testicular e fragmentação do DNA dos espermatozoides.

2. Avaliar o impacto da cirurgia bariátrica em homens obesos na função erétil, hormônios reprodutivos, função testicular e fragmentação do DNA dos espermatozoides.

3. MÉTODOS

3 MÉTODOS

3.1 Desenho do estudo e seleção dos pacientes

O estudo foi conduzido em 2 fases:

1) Fase 1 – Estudo caso-controle. Nesta fase foram incluídos no grupo controle homens voluntários à realização de vasectomia no Ambulatório de Andrologia da Divisão de Clínica Urológica do HCFMUSP, sendo estes considerados uma população comprovadamente fértil e tendo todos, no mínimo, dois filhos previamente à avaliação e IMC menor que 30kg/m^2 . Um segundo grupo foi composto de pacientes do sexo masculino em seguimento no ambulatório de obesidade da Unidade de Cirurgia Bariátrica e Metabólica (Divisão de Cirurgia do Aparelho Digestivo e Coloproctologia do Departamento de Cirurgia do HCFMUSP), originalmente portadores de obesidade Grau II ou superior ($\text{IMC} > 35\text{ kg/m}^2$), em pré-operatório para cirurgia bariátrica (grupo A1). O tipo de cirurgia bariátrica aplicado foi definido pela equipe multidisciplinar com base nas comorbidades e IMC do paciente. Por fim, um terceiro grupo foi composto de pacientes obesos provenientes do mesmo ambulatório, enquanto aguardavam cirurgia bariátrica no HCFMUSP. Estes pacientes permaneceriam em seguimento clínico para obesidade e não seriam submetidos a cirurgia bariátrica até o fim do estudo (grupo A2).

2) Fase 2 – Estudo longitudinal. Os pacientes dos grupos A1 e A2 foram acompanhados prospectivamente, por um período de 6 meses.

O desenho do estudo está apresentado na Figura 3.

Figura 3 – Desenho do estudo

3.2 Cálculo amostral

O tamanho da amostra foi calculado para alcançar poder estatístico (β) de 80% e nível de significância (α) de 0,05, em um teste monocaudal (inferindo que os parâmetros seminais e IFD são iguais ou piores nos pacientes obesos). Fariello et al., em 2012, encontrou média do IFD (soma das frequências de espermatozoides fragmentados classe III e classe IV) em pacientes eutróficos de 15,8%, e de 20,2% em pacientes obesos, e desvio padrão de 5,0.(47) Considerando-se o recrutamento de grupos de mesmo tamanho, a amostra estimada para as proposições citadas foi de 16

pacientes em cada grupo. Esperando-se perda de seguimento de pelo menos 10%, o tamanho da amostra final foi estipulado em 20 pacientes em cada grupo.

3.3 Local do estudo e financiamento

O projeto foi realizado no Laboratório de Andrologia do Centro de Reprodução Humana Governador Mário Covas do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP).

Os pacientes obesos são provenientes do Ambulatório de Obesidade da Unidade de Cirurgia Bariátrica e Metabólica (Divisão de Cirurgia do Aparelho Digestivo e Coloproctologia do Departamento de Cirurgia do HCFMUSP), e os pacientes do grupo A1 serão submetidos a cirurgia bariátrica no HCFMUSP.

As análises seminais e de fragmentação de DNA espermático foram realizadas no Laboratório de Andrologia do Centro de Reprodução Humana do HCFMUSP. Exames laboratoriais foram financiados com verba proveniente da Divisão de Urologia do HCFMUSP.

O projeto também integrou o Programa de Doutorado-sanduíche no Exterior, da Fundação CAPES. Neste programa, o aluno doutorando participou de intercâmbio no *Fertility Center* do *Massachusetts General Hospital* da *Harvard University*, em Boston-EUA. Durante este período teve, além da participação no atendimento clínico de pacientes inférteis, contato com técnicas de laboratório de reprodução humana, em especial a fragmentação do DNA espermático.

3.4 Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE)

O TCLE foi submetido para análise na Comitê de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa da Diretoria Clínica do HC-FMUSP (CAPPesq) sendo aprovado sob o registro de número 12884 (Anexo A) e na Plataforma Brasil sob o número CAAE 39428414.3.0000.0068.

Todos os homens incluídos no estudo receberam o TCLE previamente aprovado pela comissão de pesquisa e estes somente foram inclusos na pesquisa após suas respectivas assinaturas. O TCLE está em língua portuguesa, sem termos científicos e/ou elaborados, e é de fácil compreensão pelos sujeitos de pesquisa. O TCLE foi entregue aos pacientes antes da realização dos exames. Todos os dados obtidos no decorrer deste protocolo de pesquisa serão confidenciais e o sigilo destes e a privacidade de todos os pacientes serão mantidos. A identidade dos pacientes permanecerá confidencial na publicação dos resultados, conforme exigido pelas normas.

3.5 Critérios de exclusão

Os seguintes critérios de exclusão foram aplicados a todos os homens avaliados:

- Uso de droga ilícita ou medicação com interferência na função testicular;
- Homens que apresentarem níveis alterados das enzimas hepáticas (acima de 4 vezes o valor normal), insuficiência renal moderada a grave (creatinina sérica $\geq 2,0$ mg/dL);
- Histórico de exposição a substâncias tóxicas, ambientais ou ocupacionais;
- Antecedente de doenças sistêmicas ou tropicais;

- Cirurgia prévia na região inguinal ou genital;
- Antecedente de orquite pós-caxumba ou criptorquidia;
- Homens que apresentaram no exame físico: hipospádia, alteração anatômica dos epidídimos ou ductos deferentes que sugerissem processo obstrutivo ou possível anomalia congênita;

3.6 Critérios de avaliação dos pacientes

Os dados foram coletados em um banco de dados baseado na plataforma REDCap (do inglês: *Research Electronic Data Capture*).⁽¹³⁶⁾ Este é um *software* desenvolvido pela *Vanderbilt University*, de Nashville-EUA, e distribuído gratuitamente para instituições participantes do *REDCap Consortium*, entre elas o HCFMUSP. O uso deste *software* traz mais confiabilidade e segurança aos dados coletados, além de facilitar seu posterior uso em *softwares* estatísticos.

Os três grupos selecionados foram avaliados conforme os critérios abaixo listados:

- Anamnese completa, incluindo dados sobre infertilidade prévia, uso atual de medicações, comorbidades e cirurgias prévias;
- Avaliação de disfunção erétil, aplicando o Índice Internacional de Função Erétil-5 (do inglês IIEF-5);⁽¹³⁷⁾
- Avaliação do grau de atividade física, aplicando o Questionário Internacional de Atividade Física versão curta (do inglês *IPAQ short version*).⁽¹³⁸⁾ Este questionário contém questões que estimam a atividade física do indivíduo através da duração e intensidade de exercícios praticados semanalmente pelo entrevistado. Dados provenientes do IPAQ

foram convertidos em um escore de atividade física, conforme descrito em outro artigo.(138) Neste escore, valores mais altos representam indivíduos mais ativos fisicamente;

- Exame físico urológico completo;
- Análise seminal completa;
- Avaliação hormonal incluindo FSH, LH e testosterona total. Em pacientes pertencentes aos grupos de pacientes obesos também foram coletados testosterona livre, prolactina, estradiol e SHGB;
- Cariótipo de linfócitos em sangue periférico, naqueles pacientes com concentração de espermatozoides inferior a 5 milhões/mL;
- Mensuração do nível de fragmentação do DNA espermático, com o ensaio do cometa alcalino, exceto nos pacientes azoospermicos.

3.7 Exame físico

O exame físico urológico foi realizado em todos os homens por urologistas especializados em infertilidade. O volume testicular foi aferido com o orquidômetro de Prader (Figura 4), estando o paciente em decúbito dorsal horizontal.(139) Este método gráfico para mensuração do volume testicular utiliza um conjunto de 12 modelos, de forma elipsoide, feitos de plástico com volumes de 1cm³, 2cm³, 3cm³, 4cm³, 5cm³, 6cm³, 8cm³, 10cm³, 12cm³, 15cm³, 20cm³ e 25cm³. O volume testicular é estimado por meio de comparação visual ao conjunto de modelos durante a palpação dos testículos.

Figura 4 – Orquidômetro de Prader

O exame físico para pesquisa de varicocele foi realizado em consultório aquecido, estando os pacientes em posição ortostática e solicitada realização de manobra de Valsalva. A varicocele foi classificada, quando presente, de acordo com o critério modificado de Dubin & Amelar, descrito abaixo:(140)

- Grau 1: Dilatação do cordão espermático palpável somente durante a manobra de Valsalva;
- Grau 2: Dilatação do cordão espermático palpável sem a manobra de Valsalva;
- Grau 3: Dilatação volumosa do cordão espermático visível sem a manobra de Valsalva.

3.8 Análise Seminal

A análise seminal foi realizada de acordo com as normas estabelecidas pela OMS.(77) Todas as amostras de sêmen foram obtidas em salas apropriadas para coleta por meio de masturbação. Recipiente plástico de boca larga identificado, estéril e atóxico foi utilizado na coleta das amostras. Todos os pacientes foram

solicitados a realizar a coleta com abstinência sexual de 48 a 120 horas. Os pacientes que apresentem perda seminal durante a coleta são submetidos à nova coleta após período adequado de abstinência.

3.8.1 Avaliação macroscópica

Volume do ejaculado

O volume do ejaculado foi medido por aspiração de toda a amostra com o auxílio de uma pipeta graduada (Eppendorff, Hamburg, Alemanha).

pH seminal

O pH seminal foi dosado utilizando-se papel medidor de pH (faixa de pH 6,1 a 10).

3.8.2 Avaliação Microscópica

As amostras são acondicionadas em uma incubadora (Fisher, Ontário, Canadá), à temperatura de 37°C, por 20 a 30 minutos, para que se proceda à liquefação seminal. A avaliação microscópica inicial é realizada após homogeneização do sêmen com o uso do agitador de tubos vórtex (modelo AP 56, Cole-Parmer, São Paulo, Brasil), em velocidade média durante 5 segundos, determinando-se os seguintes parâmetros abaixo descritos.

Concentração espermática

A concentração espermática foi determinada através de câmaras de contagem do tipo Makler (*Makler Counting Chamber – Mid Atlantic Diagnostics, Inc.* Mount Laurel, EUA). A câmara Makler possui uma profundidade de 0,01mm e marcação graduada de 100 quadrados (área total de 1mm²), cada um com 0,1mm x 0,1mm. O volume compreendido na área de 10 quadrados após a colocação da lamínula é de 0,001 mm³ ou milhão por mL. Sendo assim, a leitura direta da concentração da amostra de sêmen (10⁶/mL) é realizada pela simples contagem dos espermatozoides presentes na área de dez quadrados. Aliquota de 5µL de sêmen liquefeito é colocado no centro da câmara de contagem e, após a colocação de lamínula, a contagem é realizada em microscopia de fase, com aumento de 200 vezes (objetiva x 20). Todos os espermatozoides móveis e imóveis são contados em três fileiras não consecutivas. A concentração espermática é determinada pela média da contagem das três fileiras, expressa em milhões de espermatozoides por mL de sêmen (10⁶/mL).

Número total de espermatozoides

O número total de espermatozoides no sêmen foi determinado pela multiplicação da concentração espermática em milhões/mL pelo volume do ejaculado em mL. O valor é descrito em milhões (x10⁶).

Motilidade espermática

A avaliação da motilidade quantitativa e qualitativa, segundo os padrões estipulados pela OMS, foi realizada na mesma câmara de contagem Makler com microscopia de fase, em aumento de 200 vezes (objetiva x 20).(77) Aliquota de 5µL de sêmen é colocada na câmara, e é realizada avaliação de 100 espermatozoides.

Esse procedimento é realizado duas vezes, sendo que em casos de diferença superior a 10% entre as duas avaliações, uma terceira contagem é realizada. A média dessas avaliações é utilizada no cálculo da motilidade. A motilidade espermática é definida pela multiplicação do número de espermatozoides móveis por 100, dividido pela concentração espermática. O resultado é expresso em porcentagem.

	Nº de espermatozoides móveis x 100
Motilidade espermática (%) =	Nº de espermatozoides móveis + imóveis

Com relação à motilidade qualitativa, os espermatozoides avaliados são distribuídos nas categorias motilidade progressiva, motilidade não progressiva, e imóveis, de acordo com o grau de movimentação. As definições dos graus de motilidade são classificadas segundo as recomendações da OMS:(141)

- Motilidade progressiva – espermatozoides móveis com progressão rápida ou lenta;
- Motilidade total – espermatozoides móveis com progressão rápida ou lenta + espermatozoides móveis sem progressão;
- Imóveis – espermatozoides imóveis.

Morfologia espermática

Na avaliação da morfologia espermática, foram preparadas lâminas pela técnica de esfregaço seminal. As lâminas são coradas por corante tipo panótico, constituído de três soluções: fixante, corante I e corante II. Cada lâmina é imersa cinco vezes na primeira solução, após secas, três vezes no corante I, seguido de cinco

imersões no corante II. O excesso dos corantes é retirado com suave gotejamento de água destilada sobre as lâminas. Após a secagem em temperatura ambiente é aplicado cimento celular (meio de inclusão rápida para microscopia – Entellan, Merck catálogo #1079610100, São Paulo, Brasil) para aderência da lamínula, conservando o aspecto do material corado. Duzentas células espermáticas, sob microscopia de imersão (1000x, objetiva x100), são avaliadas em cada amostra. Segundo o critério estrito, o espermatozoide é considerado normal quando seu segmento cefálico possuir configuração oval, absolutamente perfeita, medindo entre 5 e 6µm de comprimento e 2,5 e 3,5µm de largura.(142, 143) Além disso, quando possui o acrossoma bem definido, abrangendo cerca de 40% a 70% da porção cefálica do espermatozoide. Os segmentos cefálicos com formato limítrofe são considerados anormais, assim como a presença de qualquer vacúolo. A existência de qualquer anormalidade na peça intermediária ou na cauda é considerada anormal. A peça intermediária é considerada normal quando se apresentar delgada, anexada à parte central do corpo, medindo menos de 1µm de largura, sendo o comprimento aproximadamente uma vez e meia o do segmento cefálico. A presença de inclusão citoplasmática também é considerada anormal. A cauda é considerada normal quando se apresenta uniforme, ligeiramente mais fina que a peça intermediária, medindo aproximadamente 45µm, não podendo estar em espiral.

3.9 Avaliação da fragmentação do DNA espermático – Ensaio do cometa alcalino

Após a análise do espermograma o restante da amostra foi analisado através de uma modificação do método descrito por McKelvey-Martin et al. em 1993 (Figura

5).(144) Uma lâmina previamente preparada com uma camada de 1mL de agarose *normal melting point* é utilizada. Os exames são realizados em duplicata por paciente. Uma alíquota de esperma é diluída em agarose com baixo ponto de derretimento (LMPA – do inglês *low-melting point agarose*) a 0,7% até concentração de espermatozoides de 1×10^6 /mL. Alíquotas de 100µL são pipetadas sobre a lâmina de microscopia previamente preparada com agarose normal e coberta com uma laminula. Aguarda-se 10 minutos para solidificação a 4°C. A matriz de agarose permite trabalhar com o esperma sem fixá-lo em um ambiente de suspensão líquida. As laminulas são retiradas e são recobertas com 200µL de LMPA e cobertas com laminula. Aguarda-se 10 minutos para solidificação a 4°C, no escuro. As lâminas são, então, cobertas com 1mL de solução de lise (Triton X a 4%, 0,04mol/L de DTT, 2,5mol/L de NaCl, 0,1mol/L de EDTA, 0,01mol/L de Tris base, pH 7,5) por 20 minutos. O processo de denaturação é interrompido através de lavagem do material com água milli Q por 5 minutos a temperatura ambiente. As lâminas então são colocadas em cuba de eletroforese e recobertas com solução alcalina para eletroforese (300mM de NaOH e 1mM de EDTA). Após 20 minutos de período de estabilização, a eletroforese horizontal é realizada com solução gelada com 35V e 200mA por 20 minutos. Após o procedimento, as lâminas são lavadas com TBE (solução tampão tris-borato) e fixadas com álcool 70% e 100%. As lâminas são coradas com corante fluorescente SYBR Green para simples fitas de DNA e avaliadas em microscópio de fluorescência.

Estas lâminas foram avaliadas por um técnico treinado e 100 células serão analisadas e categorizadas em 4 padrões (Figura 6): I – Cabeça evidente e pouca cauda; II – Cabeça pouco apagada e cauda pouco aparente; III – Cabeça pouco evidente e cauda bem arrastada; IV – Cabeça bem pequena e cauda muito arrastada.

Células com pequeno cometa ou cometa ausente serão consideradas com DNA pouco fragmentado.

É definido então o índice de fragmentação do DNA através da seguinte fórmula: $IFD = [(III + IV) / (I + II + III + IV)] \times 100$.

Figura 5 – Ensaio do cometa alcalino.

NOTA: A – Aliquota de esperma diluído em agarose *low-melting* até concentração de 1 milhão/mL é aplicada sobre lâmina previamente preparada com agarose normal, e recoberta por camada de agarose *low-melting*. B – Aplicação de solução de lise sobre a lâmina por 20 minutos. C – Banho de eletroforese em solução alcalina.

Figura 6 – Padrões de dispersão do DNA dos espermatozoides no teste cometa alcalino

3.10 Técnica cirúrgica

Todos os pacientes do Grupo A1 foram submetidos a cirurgia bariátrica após a avaliação inicial. A decisão da técnica cirúrgica utilizada baseou-se em reunião multidisciplinar da Unidade de Cirurgia Bariátrica e Metabólica (Divisão de Cirurgia do Aparelho Digestivo e Coloproctologia do Departamento de Cirurgia do HCFMUSP). Todos os pacientes foram operados no HCFMUSP. Complicações cirúrgicas foram categorizadas pela classificação de Clavien-Dindo.(145)

A DGYR é realizada com a confecção de nova bolsa gástrica com volume aproximado de 30 a 50mL, sem anel de silicone. O restante do estômago, duodeno e jejuno proximal ficam excluídos do fluxo de nutrientes através da derivação em Y-de-Roux, com alça biliopancreática de aproximadamente 60 a 80

centímetros e alça alimentar entre 100 a 120 centímetros. A cirurgia pode ser realizada através de videolaparoscopia ou convencionalmente através de laparotomia mediana.(146)

A gastrectomia vertical é realizada através da desvascularização da grande curvatura gástrica, a partir de região a cinco centímetros do piloro até o ângulo de His. Utilizando-se de grampeadores lineares cortantes, é confeccionado um tubo gástrico calibrado com sonda de Fouchet de calibre 32 French para garantir que este tenha lúmen interno aproximado de 3 centímetros. Ocasionalmente é realizada sutura contínua sero-muscular para garantir a hemostasia da linha de grampo. A cirurgia também pode ser realizada por via laparoscópica ou convencional.(147)

3.11 Análise Estatística

As variáveis quantitativas foram descritas como mediana e intervalo interquartil (25% a 75%). Os testes comparativos foram determinados após avaliação da normalidade da distribuição das variáveis. Variáveis quantitativas com distribuição normal foram comparadas utilizando-se os testes T de Student pareados ou não-pareados. O teste não-paramétrico de Mann-Whitney U não-pareado ou o teste de Wilcoxon pareado foram utilizados para comparar as variáveis quantitativas sem distribuição normal. Quando aplicável, foi utilizada regressão linear para estabelecer relação entre duas variáveis quantitativas.

As variáveis categóricas foram descritas como número e porcentagem e, neste caso, foi utilizado o teste qui-quadrado de Pearson ou teste exato de Fisher, a depender da distribuição entre os grupos.

Por fim, modelos lineares gerais (do inglês: *General Linear Models*) com utilização do recurso estatístico média dos mínimos quadrados (LS-Means) foram utilizadas para a análise multivariada, controlando as variáveis quantitativas pelas variáveis com diferença significativa entre os grupos.

Todas as análises estatísticas foram feitas com o software SAS® (Versão 9.4, SAS Institute Inc., Cary-NC, EUA). Todos os testes foram bicaudais e o valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

4. RESULTADOS

4 RESULTADOS

Ao final do estudo, foram incluídos 74 pacientes, sendo 32 pacientes no grupo controle, 22 pacientes no grupo A1 e 20 pacientes no grupo A2. A inclusão dos pacientes seguiu organograma representado na Figura 7. Todos foram devidamente orientados sobre a participação no estudo e concordaram, assinando o TCLE. Em seguida passaram por avaliação clínica, coleta de exames hormonais e coleta de amostra de sêmen para análise seminal convencional e para análise da fragmentação do DNA dos espermatozoides.

Os dados demográficos de toda a população em análise encontram-se nas Tabelas 1 e 2.

Figura 7 – Organograma da inclusão de pacientes no estudo.

NOTA: IMC – Índice de massa corpórea; ICC – Insuficiência cardíaca congestiva.

Tabela 1 – Dados demográficos da população total, variáveis contínuas

	Mediana (IIQ) N = 74
Idade (anos)	39,5 (14,0)
Escore de atividade física	485,1 (2376,0)
IMC (kg/m ²)	39,6 (18,2)
RCQ (cm)	1,0 (0,1)
Tamanho testículo direito (cm ³)	15,0 (6,0)
Tamanho testículo esquerdo (cm ³)	13,5 (6,0)

NOTA: IIQ: intervalo interquartil; IMC: índice de massa corpórea; RCQ: relação cintura quadril.

Tabela 2 – Dados demográficos da população total, variáveis categóricas

	N (% do total) N = 74
HAS	29 (39)
Diabetes mellitus	18 (24)
Tabagismo	7 (9)
Etilismo	40 (54)
Varicocele	16 (22)

NOTA: HAS: hipertensão arterial sistêmica.

4.1 Fase 1 – Estudo caso-controle

4.1.1 Avaliação clínica

Neste momento do estudo, as análises estatísticas foram realizadas comparando o grupo controle ao conjunto de pacientes obesos (grupos A1 e A2). Resultados estão expostos nas tabelas 3 e 4 e na Figura 8. Medianas da idade e do IMC dos pacientes foram menores no grupo controle, com significância estatística

(valores de $p < 0,0001$ e $0,0277$, respectivamente). Como esperado, foi encontrada maior prevalência de pacientes hipertensos e diabéticos no grupo de pacientes obesos ($p < 0,0001$). Não houve diferença estatística na prevalência de etilismo e tabagismo. Pacientes do grupo obesos são mais sedentários que os do grupo controle, sendo que mais da metade dos pacientes obesos não fazem nenhum tipo de atividade física ($p = 0,0003$). Varicocele foi mais prevalente no grupo controle ($0,0081$).

Tabela 3 – Dados demográficos separados por grupo, variáveis contínuas

	Controles N = 32	Obesos N = 42	p
Idade (anos)	36,5 (15,0)	40,0 (14,0)	0,0277[#]
Escore de atividade física ^{\$}	3581,8 (4422,3)	1058,1 (2459,0)	0,0003*
IMC (kg/m ²)	27,1 (5,4)	45,1 (8,8)	< 0,0001*
RCQ (cm)	1,00 (0,06)	1,08 (0,09)	< 0,0001[#]
Tamanho testículo dir. (cm ³)	12 (3,0)	15 (10,0)	0,1060*
Tamanho testículo esq. (cm ³)	12 (5,0)	15 (8,0)	0,0013*

NOTA: Valores mostrados em Mediana (Intervalo interquartil). IMC: índice de massa corpórea; RCQ: relação cintura quadril. \$ – Escore de atividade física apresentado em Média (Desvio-padrão), já que a mediana no grupo obesos foi igual a zero; # – Teste T não-pareado; * – Teste de Mann-Whitney U. O valor $p < 0,05$ foi considerado significativo.

Figura 8 – Distribuição do índice de massa corpórea dos pacientes do grupo obesos

Tabela 4 – Dados demográficos separados por grupo, variáveis categóricas

	Controles N = 32	Obesos N = 42	p
HAS	3 (9)	26 (62)	< 0,0001 [#]
Diabetes mellitus	0	18 (43)	< 0,0001 [#]
Tabagismo	5 (16)	2 (5)	0,2276*
Etilismo	16 (50)	24 (57)	0,5413 [#]
Varicocele ^κ	12 (38)	4 (10)	0,0038 [#]
- Grau I	8 (25)	2(5)	
- Grau II	2 (6)	0	0,0081*
- Grau III	2 (6)	2 (5)	

NOTA: Valores mostrados em N (% do total). HAS: hipertensão arterial sistêmica. κ – Maior grau de varicocele apresentado. O valor $p < 0,05$ foi considerado significativo. # – Teste Qui-quadrado; * – Teste exato de Fisher.

4.1.2 Disfunção erétil

Resultados da aplicação do IIEF-5 estão apresentados na Tabela 5. Não houve diferença no escore do IIEF-5 entre os grupos estudados.

Tabela 5 – Comparação do escore IIEF-5 dividido entre os grupos

	Controles N = 32	Obesos N = 42	p
Escore IIEF-5	24 (3,5)	24,0 (7,0)	0,8721*

NOTA: IIEF-5: Índice Internacional de Função Erétil-5 (em inglês, *International Index of Erectile Function*). Valores mostrados em Mediana (intervalo interquartil). * – Teste de Mann-Whitney U. O valor $p < 0,05$ foi considerado significativo.

4.1.3 Avaliação hormonal

Os exames coletados dos indivíduos do grupo controle incluíram estradiol, LH, FSH e testosterona total. Indivíduos do grupo de pacientes obesos foram avaliados também para prolactina, SHBG e testosterona livre.

Pacientes obesos apresentaram níveis séricos de estradiol 51% maiores do que os controles ($p = 0,0003$), e testosterona total bem inferior à apresentada pelos controles ($p=0,0008$). Níveis de FSH e LH também foram maiores nos pacientes obesos, com significância estatística ($p = 0,0060$ e $0,0004$, respectivamente). Dados relativos à avaliação hormonal estão expostos na Tabela 6 e na Figura 9.

Tabela 6 – Comparação dos exames hormonais entre os grupos

	Controles N = 32	Obesos N = 42	P
Estradiol (pg/mL)	22,0 (17,9)	33,3 (16,7)	0,0003*
LH (IU/L)	4,1 (2,2)	6,3 (3,5)	0,0004*
FSH (IU/L)	3,2 (1,6)	4,8 (3,5)	0,0060*
Prolactina (ng/mL)	-	8,5 (5,5)	-
SHBG (nmol/L)	-	35,5 (18,2)	-
Testosterona total (ng/dL)	413,0 (135,0)	272,5 (242,0)	0,0008[#]
Testosterona livre (pmol/L)	-	185,0 (104,0)	-

NOTA: Valores mostrados em Mediana (Intervalo interquartil). IIQ: intervalo interquartil; LH: hormônio luteinizante; FSH: hormônio folículo-estimulante; SHBG: globulina ligadora de hormônios sexuais. # – Teste T não-pareado; * – Teste de Mann-Whitney U. O valor $p < 0,05$ foi considerado significativo.

Figura 9 – Diagrama de caixa dos valores dos hormônios séricos, divididos por grupos

NOTA: LH: hormônio luteinizante; FSH: hormônio folículo-estimulante; SHBG: globulina ligadora de hormônios sexuais.

4.1.4 Análise seminal

Foram identificados três pacientes azoospermicos no grupo de pacientes obesos e nenhum paciente azoospermico no grupo controle. Dados destes pacientes foram incluídos na análise de volume, concentração e total de espermatozoides ejaculados, mas não foram computados na análise de motilidade, morfologia e fragmentação de DNA. Foi comparada também a prevalência de pacientes com concentração abaixo de 15 milhões/mL e 5 milhões/mL entre os grupos, detalhados como oligospermia e oligospermia grave, respectivamente. Análise de cariótipo de sangue periférico foi solicitada em todos os pacientes com concentração abaixo de 5 milhões/mL, sem nenhuma alteração identificada.

Pacientes obesos apresentaram menor volume ejaculado, menor concentração de espermatozoides, menor número total de espermatozoides, menor motilidade total e progressiva e menor morfologia normal. A prevalência de pacientes oligospermicos e de pacientes oligospermicos graves foi maior nos pacientes obesos, com significância estatística. Dados estão expostos na Tabela 7.

Tabela 7 – Comparação da análise seminal entre os grupos

	Controles N = 31	Obesos N = 39	p
<i>N (% do total)</i>			
Tempo de abstinência			
Menor que 2 dias	0	4 (10)	
Entre 2 e 5 dias	26 (84)	23 (59)	0,0051^{\$}
Maior que 5 dias	5 (16)	12 (31)	
Azoospermia	0	3 (8)	0,2491 ^{\$}
Oligospermia	0	14 (36)	0,0009[‡]
Oligospermia grave	0	9 (23)	0,0036^{\$}
Leucocitospermia	3,0 (10,0)	3,0 (8,0)	1*
<i>Mediana (IIQ)</i>			
Volume ejaculado (mL)	2,5 (1,5)	1,5 (1,0)	< 0,0001*
Concentração (10 ⁶ /mL)	82 (45,0)	43,0 (86,5)	0,0183*
Núm. de espermatozoides (10 ⁶)	205,2 (217,0)	82,5 (167,0)	0,0002*
Motilidade total (%)	72,0 (20,0)	54,5 (32,0)	0,0004*
Motilidade progressiva (%)	54,0 (21,0)	27,5 (29,0)	< 0,0001[#]
Morfologia normal (%)	3,0 (3,0)	2,0 (3,0)	0,0098*

NOTA: IIQ: intervalo interquartil. [‡] – Teste Qui-quadrado; ^{\$} – Teste exato de Fisher; [#] – Teste T não-pareado; * – Teste de Mann-Whitney U. O valor p<0,05 foi considerado significativo.

4.1.5 Fragmentação do DNA espermático

Indivíduos obesos apresentaram IFD muito superior aos índices dos controles (p = 0,092). Resultados são apresentados na Tabela 8 e na Figura 10.

Figura 10 – Diagrama de caixa dos valores do índice de fragmentação de DNA, divididos por grupos

NOTA: Espermatozoides Classe III e Classe IV foram considerados portadores de DNA fragmentado.

Tabela 8 – Comparação do índice de fragmentação de DNA entre os grupos

	Controles N = 29	Obesos N = 33	p
Índice de fragmentação de DNA (%)	24,0 (24,5)	48,0 (31,0)	0,0092[#]
Classe I (%)	54,5 (38,0)	21,0 (24,0)	< 0,0001*
Classe II (%)	15,0 (14,0)	31,0 (29,0)	0,0003*
Classe III (%)	17,0 (19,0)	28,0 (26,0)	0,0059*
Classe IV (%)	4 (5,0)	8,0 (18,0)	0,3086*

NOTA: Valores mostrados em Mediana (intervalo interquartil). Espermatozoides Classe III e Classe IV foram considerados portadores de DNA fragmentado. [#] – Teste T não-pareado; * – Teste de Mann-Whitney U. *O valor $p < 0,05$ foi considerado significativo.

4.1.6 Análises adicionais

Por fim, para estimar o poder de associação entre IMC e as variáveis com diferenças estatisticamente significantes entre os grupos, foram utilizados modelos de regressão linear. Neste estudo, valores mais elevados de R^2 ajustado indicam maior poder de predição da variável estudada de acordo com a variação do IMC. As associações mais fortes com a variação do IMC foram encontradas para as variáveis número total de espermatozoides, motilidade total, valor de testosterona sérica e de estradiol sérico, com valor de R^2 ajustado 0,1151, 0,1471, 0,2514 e 0,1627, respectivamente. Essa análise significa, por exemplo, que o valor da testosterona total dos indivíduos analisados variou 6,49 ng/dL para baixo a cada elevação de uma unidade do IMC, partindo do valor base de 605,4 ng/dL. Além disso, elevação do IMC de 25 para 40 kg/m², por exemplo, resultou em variação do valor predito de estradiol de 22,3 para 30,4 pg/mL. Os gráficos resultantes desta análise e suas respectivas equações resultantes são mostrados a seguir na Figura 11.

Figura 11 – Gráficos de dispersão de regressão linear – Fase 1

NOTA: A reta de regressão representa a variação das variáveis analisadas em relação à variação do IMC. A área entre as linhas pontilhadas representa o valor predito da variável em relação ao IMC, com 95% de confiança. IMC: Índice de massa corpórea.

Procedemos então à análise multivariada dos resultados obtidos. Variáveis significantes foram ajustadas por idade, presença de varicocele, tabagismo, etilismo e grau de atividade física, utilizando-se o recurso estatístico média dos mínimos quadrados (*LS-Means*). Avaliação hormonal também foi ajustada por horário da coleta de sangue (classificados como antes das 9:00, entre 9:00 e 12:00, e depois das 12:00), visto que o ritmo circadiano dos hormônios sexuais poderia influenciar os resultados. Análise seminal também foi ajustada pelo tempo de abstinência em dias.

Na avaliação hormonal, persistiram os efeitos da obesidade sobre testosterona total, LH, FSH e estradiol. Nos parâmetros seminais, houve diferença nas variáveis

volume seminal, total de espermatozoides ejaculados, motilidade total, motilidade progressiva, morfologia de Kruger e IFD. As diferenças estimadas entre as médias e respectivos intervalos de confiança de 95% estão expostos na Tabela 9.

Tabela 9 – Análise multivariada: diferença estimada entre os grupos após ajuste por covariáveis

	Diferenças estimadas	p
Estradiol (pg/mL)	-13,55 (-21,70 – -5,39)	0,0015
LH (IU/L)	-2,16 (-3,40 – -0,92)	0,0009
FSH (IU/L)	-2,01 (-3,99 – -0,04)	0,0455
Testosterona total (ng/dL)	120,9 (39,3 – 202,6)	0,0043
Volume ejaculado (mL)	1,06 (0,30 – 1,82)	0,0070
Núm. de espermatozoides (10^6)	107,6 (12,6 – 202,7)	0,0272
Motilidade total (%)	18,9 (6,5 – 31,2)	0,0034
Motilidade progressiva (%)	17,9 (6,7 – 29,0)	0,0022
Morfologia normal (%)	1,5 (0,2 – 2,8)	0,0266
IFD (%)	-15,5 (-30,2 – -0,9)	0,0379

NOTA: Valores mostrados em diferença estimada entre as médias (Controles – Obesos, intervalo de confiança de 95%), após ajuste pela média dos mínimos quadrados. Hormônios ajustados por idade, varicocele, horário do coleta, tabagismo e etilismo. Análise seminal ajustada por idade, varicocele, tempo de abstinência, tabagismo e etilismo. *O valor $p < 0,05$ foi considerado significativo.

4.2 Fase 2 – Estudo longitudinal

Todos os pacientes incluídos no Grupo A1 e nenhum paciente do Grupo A2 foram submetidos a cirurgia bariátrica. Seis meses após a cirurgia (Grupo A1) ou após a avaliação inicial (Grupo A2), todos foram reconvocados para nova avaliação. No total, 10 pacientes não compareceram – 4 pacientes do Grupo A1 e 6 do Grupo A2. Procedeu-se então à análise estatística incluindo somente os pacientes presentes

em ambas as avaliações. Foram incluídos, portanto, 18 pacientes no Grupo A1 e 14 no Grupo A2.

4.2.1 Cirurgia bariátrica

Quinze pacientes foram submetidos a cirurgia de DGYR, sendo 7 por via aberta e 8 por via videolaparoscópica. Três pacientes foram submetidos a gastrectomia vertical por via videolaparoscópica. Mediana de tempo de internação foi de 4 dias. Somente 2 pacientes apresentaram complicações nos primeiros 30 dias após a cirurgia, classificadas como Clavien-Dindo Grau I.

4.2.2 Avaliação clínica

Pacientes do Grupo A1 apresentaram queda da mediana do IMC em 11,6 kg/m². Também houve queda da prevalência de hipertensão arterial sistêmica e etilismo. Houve aumento do valor do escore de atividade física, mas sem diferença estatística. Nos pacientes que não foram submetidos à cirurgia bariátrica, por outro lado, não houve alteração destes parâmetros. Esses dados estão expostos nas tabelas 10 e 11.

Tabela 10 – Dados demográficos, variação após 6 meses de seguimento. Variáveis contínuas

	Grupo A1 Cirurgia bariátrica – N = 18			Grupo A2 Seguimento – N = 14		
	Pré	Pós	p	Pré	Pós	p
Escore de atividade física ^{\$}	1492 (3528,3)	1927,7 (2563,4)	0,2522 [#]	1091,0 (1365,0)	1249,6 (2628,2)	0,7344 [*]
IMC (kg/m ²)	43,9 (11,6)	32,3 (5,5)	<0,0001[#]	43,9 (8,0)	45,0 (10,0)	0,3743 [#]
Tamanho testículo dir. (cm ³)	17,5 (8,0)	20 (8,0)	0,5625 [*]	12,0 (5,0)	13,5 (8,0)	0,1953 [*]
Tamanho testículo esq. (cm ³)	17,5 (8,0)	20 (8,0)	0,3750 [*]	13,5 (8,0)	15,0 (8,0)	1 [*]

NOTA: Valores mostrados em Mediana (Intervalo interquartil). IMC: índice de massa corpórea. \$ – Escore de atividade física apresentado em Média (Desvio-padrão); # – Teste T pareado; * – Teste de Wilcoxon pareado. O valor p<0,05 foi considerado significativo.

Tabela 11 – Dados demográficos, variação após 6 meses de seguimento. Variáveis categóricas

	Grupo A1 Cirurgia bariátrica – N = 18			Grupo A2 Seguimento – N = 14		
	Pré	Pós	p	Pré	Pós	p
HAS	10 (55,6)	3 (16,7)	0,0151[#]	10 (71,4)	10 (71,4)	1 [*]
Diabetes mellitus	7 (38,9)	2 (11,1)	0,1212 [*]	7 (50,0)	6 (42,9)	0,7047 [#]
Tabagismo	0	1 (5,6)	1 [*]	1 (7,1)	3 (21,4)	0,5956 [*]
Etilismo	10 (55,6)	3 (16,7)	0,0151[#]	7 (50,0)	5 (35,7)	0,4450 [#]

NOTA: Valores mostrados em Mediana (Intervalo interquartil). HAS: hipertensão arterial sistêmica. # – Teste Qui-quadrado; * – Teste exato de Fisher. O valor p<0,05 foi considerado significativo.

4.2.3 Disfunção erétil

Nenhum dos grupos apresentou alteração do valor do escore IIEF-5 no período de reavaliação. Resultados estão apresentados na Tabela 12.

Tabela 12 – Escore IIEF-5, variação após 6 meses de seguimento.

	Grupo A1 Cirurgia bariátrica – N = 18			Grupo A2 Seguimento – N = 14		
	Pré	Pós	p	Pré	Pós	p
Escore IIEF-5	22,5 (9,0)	22,5 (7,0)	0,7632 [#]	23,0 (9,0)	21,5 (10,0)	0,8359 [*]

NOTA: IIEF-5: Índice Internacional de Função Erétil-5 (em inglês, *International Index of Erectile Function*). Valores mostrados em Mediana (intervalo interquartil). # – Teste T pareado; * – Teste de Wilcoxon pareado. O valor $p < 0,05$ foi considerado significativo.

4.2.4 Avaliação hormonal

A testosterona total e livre dos pacientes submetidos a cirurgia bariátrica mostrou aumento expressivo no período avaliado. Enquanto a mediana dos níveis de testosterona livre subiu aproximadamente 33%, a mediana de testosterona total mais que dobrou ($p = 0,0026$ e $< 0,0001$, respectivamente). Valores de FSH, prolactina e SHBG também apresentaram alterações estatisticamente significantes, expostas na Tabela 13 e na Figura 12. No Grupo A2, por outro lado, não houve diferenças estatísticas entre os valores pré e pós seguimento.

Figura 12 – Diagrama de caixa dos valores de testosterona total e testosterona livre, antes e depois da cirurgia bariátrica, nos pacientes do grupo A1

Tabela 13 – Exames hormonais, variação após 6 meses de seguimento.

	Grupo A1 Cirurgia bariátrica – N = 18			Grupo A2 Seguimento – N = 14		
	Pré	Pós	p	Pré	Pós	p
Estradiol (pg/mL)	33,3 (20,4)	34,0 (13,7)	0,6800 [#]	29,2 (10,0)	22,5 (28,9)	0,1988 [#]
LH (IU/L)	5,8 (4,0)	6,5 (3,9)	0,5604 [#]	6,3 (2,0)	7,2 (4,4)	0,1238 [#]
FSH (IU/L)	4,1 (3,6)	5,1 (4,6)	0,0002*	6,0 (4,3)	6,0 (4,0)	0,2603*
Prolactina (ng/mL)	9,0 (4,5)	6,8 (3,4)	0,0024*	8,5 (6,2)	10,4 (5,8)	0,1909*
SHBG (nmol/L)	35,5 (17,2)	68,5 (43,0)	<0,0001*	32,6 (16,2)	29,5 (22,3)	0,5313*
Testosterona total (ng/dL)	294,5 (205,5)	604,0 (343,0)	<0,0001[#]	231,5 (216,0)	200,5 (216,0)	0,4562 [#]
Testosterona livre (pmol/L)	198,5 (116,5)	264,0 (110,0)	0,0026[#]	162,0 (79,0)	145,0 (84,0)	0,7861 [#]

NOTA: Valores mostrados em Mediana (Intervalo interquartil). LH: hormônio luteinizante; FSH: hormônio foliculo-estimulante; SHBG: globulina ligadora de hormônios sexuais. # – Teste T pareado; * – Teste de Wilcoxon pareado. O valor $p < 0,05$ foi considerado significativo.

4.2.5 Análise seminal

Na reavaliação em 6 meses, um paciente de cada grupo não conseguiu fornecer amostra de sêmen para análise. Foram avaliados então 17 pacientes do Grupo A1 e 13 do Grupo A2.

Foi observada queda da concentração seminal ($p = 0,0022$) e da quantidade total de espermatozoides no ejaculado ($p = 0,0017$) nos indivíduos submetidos a cirurgia bariátrica (Figura 13). Além disso, 2 pacientes do Grupo A1 tornaram-se azoospérmicos ao fim do seguimento. Estes pacientes tinham concentração seminal pré-operatória de 0,1 e de 82 milhões/mL. Adicionalmente, houve aumento da prevalência de pacientes oligospérmicos e de pacientes oligospérmicos graves após o fim do estudo. Estas prevalências, no entanto, não alcançaram diferenças estatisticamente significantes.

No Grupo A2, valores de parâmetros seminais não apresentaram diferenças estatísticas entre as avaliações realizadas. Resultados estão expostos na Tabela 14.

Figura 13 – Diagrama de caixa dos valores de concentração seminal e total de espermatozoides no ejaculado, antes e depois da cirurgia bariátrica, nos pacientes do grupo A1

Tabela 14 – Análise seminal, variação após 6 meses de seguimento.

	Grupo A1 Cirurgia bariátrica – N = 17			Grupo A2 Seguimento – N = 13		
	Pré	Pós	p	Pré	Pós	p
<i>N (% do total)</i>						
Abstinência						
< 2 dias	1 (5,9)	3 (17,7)		2 (16,7)	0	
Entre 2 e 5 dias	9 (52,9)	11 (54,7)	0,2524 ^{\$}	8 (66,7)	11 (84,6)	0,4671 ^{\$}
> 5 dias	7 (41,2)	3 (17,7)		2 (16,7)	2 (16,7)	
Oligospermia	2 (11,8)	7 (41,2)	0,1175 ^{\$}	7 (53,9)	7 (53,9)	1 ^φ
Oligospermia grave	1 (5,9)	5 (29,4)	0,1748 ^{\$}	4 (30,8)	3 (23,1)	1 ^φ
Azoospermia	0	2 (11,8)	0,4848 ^{\$}	1 (7,7)	1 (7,7)	1 ^{\$}
Leucocitospermia	2 (12,5)	5 (29,4)	0,3983 ^{\$}	1 (7,7)	2 (18,2)	0,5761 ^{\$}
<i>Mediana (IIQ)</i>						
Volume ejaculado (mL)	1,5 (0,8)	1,2 (1,0)	0,3826*	1,0 (1,7)	1,0 (1,3)	0,6470*
Concentração (10 ⁶ /mL)	72,5 (110,0)	47,0 (67,3)	0,0022*	14,0 (26,5)	13,0 (65,3)	0,2744*
Núm. de espermatozoides (10 ⁶)	122,8 (133,5)	17,0 (80,7)	0,0017*	22,0 (28,8)	13,0 (66,6)	0,2334*
Motilidade total (%)	64,5 (25,0)	52,0 (29,0)	0,1926 [#]	41 (40,5)	43,5 (25,5)	0,1592 [#]
Motilidade progressiva (%)	39,0 (29,0)	31,0 (32,0)	0,2187 [#]	18,5 (25,5)	18,0 (26,5)	0,5091 [#]
Morfologia normal (%)	3,0 (2,0)	2,0 (3,0)	0,9143*	0,0 (2,5)	1,0 (3,0)	0,3750*

NOTA: IIQ: intervalo interquartil. φ – Teste Qui-quadrado; \$ – Teste exato de Fisher; # – Teste T pareado; * – Teste de Wilcoxon pareado. O valor p<0,05 foi considerado significativo.

4.2.6 Fragmentação do DNA espermático

Mediana do IFD apresentou queda após a cirurgia bariátrica, mas sem significância estatística (p=0,0587). Analisados isoladamente, no entanto, a

porcentagem de espermatozoides Classe I (Cabeça evidente e pouca cauda – considerado não fragmentado) apresentou aumento após cirurgia ($p = 0,0049$), em variação oposta aos espermatozoides Classe III (Cabeça pouco evidente e cauda bem arrastada – considerado fragmentado), que apresentaram diminuição após a cirurgia ($p = 0,0155$). Novamente, avaliação dos pacientes do Grupo A2 não mostrou diferenças entre as avaliações. Resultados estão apresentados na Tabela 15.

Tabela 15 – Fragmentação de DNA espermático, variação após 6 meses de seguimento.

	Grupo A1 Cirurgia bariátrica – N = 16			Grupo A2 Seguimento – N = 12		
	Pré	Pós	p	Pré	Pós	p
Índice de fragmentação de DNA (%)	49,5 (23,0)	36,5 (35,0)	0,0587 [#]	38,5 (27,0)	37,0 (47,5)	0,7505 [#]
Classe I (%)	12,5 (19,0)	30,5 (33,0)	0,0049*	25,5 (21,0)	26,5 (36,0)	0,7969*
Classe II (%)	33,5 (18,5)	29,0 (16,5)	0,4505 [#]	36,0 (34,0)	31,0 (18,0)	0,3624 [#]
Classe III (%)	41,0 (30,5)	23,0 (15,5)	0,0155*	27,0 (9,0)	16,5 (19,5)	0,6289*
Classe IV (%)	7,0 (16,0)	5,5 (21,5)	0,8441*	7,0 (18,0)	8,5 (19,5)	0,5586*

NOTA: Valores mostrados em Mediana (Intervalo interquartil). Espermatozoides Classe III e Classe IV foram considerados portadores de DNA fragmentado. # – Teste T pareado; * – Teste de Wilcoxon pareado. O valor $p < 0,05$ foi considerado significante.

4.2.7 Análises adicionais

Foram aplicados testes de regressão linear para avaliar se a magnitude da perda de peso esteve relacionada à amplitude dos efeitos nas variáveis estudadas. Para este cálculo foi utilizada a variação do IMC entre os dois períodos estudados, em porcentagem. Por convenção, valores positivos desta variável representam perda de peso.

Perda de peso esteve fortemente relacionada a elevação dos níveis séricos de testosterona total, testosterona livre e SHBG, com valor de R^2 ajustado de 0,7031, 0,3020 e 0,4701, respectivamente. Neste modelo, por exemplo, variação negativa do IMC em 10% representou elevação do valor predito de testosterona total sérica em 131,2 ng/dL. Modelos de regressão linear com significância estatística também foram obtidos para o número total de espermatozoides no ejaculado e para o valor de FSH sérico. Estes dados estão expostos na Figura 14.

Figura 14 – Gráficos de dispersão de regressão linear – Fase 2

NOTA: A reta de regressão representa a variação das variáveis analisadas em relação à queda do IMC. A área entre as linhas pontilhadas representa o valor predito da variável em relação à queda do IMC, com 95% de confiança. IMC: Índice de massa corpórea. QIMC: Queda do IMC em porcentagem.

5. DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

O aumento progressivo da prevalência da obesidade pode ser classificado como uma pandemia global.(148) Estudo de 2014 reportou que mais de um terço da população mundial são portadores de sobrepeso ou obesidade.(15) Adicionalmente, o mesmo estudo traz outras duas considerações alarmantes: primeiro, em mais de 3 décadas, nenhum dos 188 países estudados apresentou queda da prevalência de obesidade, em caminho oposto ao de outros riscos à saúde global, como tabagismo e desnutrição infantil. Estes dados sugerem que as medidas de saúde pública atualmente aplicadas não têm surtido efeito para evitar a progressão da doença. Segundo, paralelamente a este aumento, a prevalência de obesidade em crianças e adolescentes vem crescendo de maneira alarmante, tanto em países desenvolvidos quanto em países em desenvolvimento (de 8,1% em 1980 para 12,9% em 2013, em meninos do sexo masculino de países em desenvolvimento, representando aumento de mais de 50%). Os prejuízos causados pela obesidade podem, portanto, iniciar-se durante ou até mesmo antes da puberdade, sendo potencialmente mais danosos à saúde reprodutiva destes indivíduos.

A obesidade, em associação com hipertensão arterial sistêmica, resistência insulínica, hiperglicemia e dislipidemia, faz parte de um conjunto de distúrbios classificados como síndrome metabólica.(149) São múltiplos os prováveis mecanismos pelos quais a síndrome metabólica é capaz de gerar prejuízos à saúde humana. Inflamação crônica de baixa intensidade e ativação do sistema imune já foram claramente estabelecidos na síndrome metabólica, e fazem parte desta

fisiopatologia.(150, 151) Adicionalmente, o tecido adiposo é intensamente ativo do ponto de vista endócrino e metabólico, e substâncias produzidas pelos adipócitos (adipocitocinas) estão envolvidas na regulação de diversos órgãos e sistemas.(152)

Somadas a estas alterações metabólicas, a obesidade está associada a intensa desregulação hormonal. O mecanismo mais provável consiste na atividade aumentada da enzima aromatase, a qual tem elevada expressão no tecido adiposo.(153) O aumento da conversão periférica da testosterona em estradiol é consistente com perfil hormonal frequentemente encontrado nas populações de homens obesos, de hipogonadismo hiperestrogênico, por desbalanço da relação testosterona/estradiol.(44) Além disso, níveis elevados de estradiol e queda nos valores de SHBG podem levar a efeito de *feedback* negativo sobre o eixo HHG, diminuindo o efeito compensatório esperado de elevação de gonadotrofinas.(34) Este ciclo, em que obesidade gera desbalanço hormonal com queda da testosterona, induz mais deposição de gordura abdominal e conseqüentemente piora da obesidade, levando à perpetuação da doença e dificultando ainda mais seu tratamento.(154)

As evidências mais atuais dos efeitos da obesidade sobre os hormônios sexuais provêm de metanálise publicada em 2010 por Macdonald et al.(44) Neste estudo, foram incluídos 18 artigos que compararam hormônios reprodutivos em relação ao IMC, totalizando mais de 15.000 pacientes. A conclusão da metanálise é que há forte relação negativa entre IMC e níveis séricos de testosterona total e SHBG. Além disso, sugere também redução dos valores de testosterona livre em pacientes obesos, mas em associação mais fraca. Somente 4 artigos, no entanto, mostraram relação entre obesidade e elevação de estradiol.

O presente estudo tem características únicas, graças à conjuntura atual da saúde pública brasileira. Todos os pacientes obesos incluídos no trabalho fazem ou fizeram parte de uma fila única em que aguardam a oportunidade de serem submetidos à cirurgia bariátrica no Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo. A escassez nacional de centros e profissionais especializados nesta cirurgia leva à concentração de milhares de pacientes em poucos serviços, gerando situação anômala em que pacientes podem aguardar pela cirurgia por mais de sete anos. Consequentemente, os pacientes estudados aqui sofreram não somente o impacto negativo da obesidade, mas também seus efeitos progressivos de longos anos padecendo com a patologia. Na fase 1 deste estudo, a mediana do IMC dos pacientes obesos foi acima de 45 kg/m^2 , e quase 30% dos indivíduos tinha IMC acima de 50 kg/m^2 , situação que alguns autores classificam como superobesidade. Sendo assim, é possível que os resultados aqui mostrados, nos quais observamos não só a redução da testosterona total nos pacientes obesos, mas também a elevação de níveis de estradiol, LH e FSH, sejam resultantes de efeitos ainda mais profundos da obesidade, causados tanto pela intensidade do ganho de peso quanto pelo tempo prolongado de doença.

A associação entre obesidade e alteração dos parâmetros seminais, no entanto, não é tão bem estabelecida na literatura. A maioria dos estudos que tentou estabelecer esta relação incluiu em sua análise pacientes provenientes de clínicas de reprodução, reduzindo drasticamente o poder de generalização dos resultados obtidos. Em 2008, Aggerholm et al. publicaram estudo bem conduzido relativo a esta hipótese.⁽⁴¹⁾ Neste artigo, foram incluídos mais de 2000 homens provenientes de 8 países europeus sem antecedentes de infertilidade conhecida. Apesar da grande representatividade populacional deste estudo, e de sua

distribuição de homens obesos ser superior a maior parte dos estudos já realizados (aproximadamente 8% dos pacientes incluídos tem IMC maior que 30kg/m^2), homens obesos são classificados neste trabalho somente em um grupo único de pacientes com IMC maior que 30 kg/m^2 . Metanálise publicada por Macdonald et al. em 2010 também sofre da mesma limitação.(44) Neste trabalho, os 5 artigos incluídos na análise dos parâmetros seminais também não utilizavam classificação mais detalhada dos pacientes obesos, e a compilação dos resultados não mostrou efeito do IMC sobre parâmetros seminais. Esta simplificação da classificação da obesidade dificulta a extrapolação dos resultados para populações portadoras de obesidade mais grave, com provável maior potencial de dano à função testicular. Além disso, 2 dos trabalhos incluídos eram compostos por pacientes em busca de tratamento para infertilidade.

Em 2013, Sermondade et al. publicaram nova metanálise mais abrangente, e utilizando-se de alguns recursos estatísticos.(45) Foram incluídos dados completos de mais de 13.000 pacientes provenientes de 20 estudos, ao contrário da metanálise anterior, que utilizou somente os resultados dos trabalhos analisados. Além disso, ao invés de comparar somente médias de concentração seminal, os autores compararam prevalências de azoospermia e oligospermia, encontrando maior prevalência destas situações em pacientes obesos, e taxas ainda maiores em pacientes obesos mórbidos (razão de chance para oligospermia e azoospermia de 1,31 em pacientes obesos e de 1,97 em obesos mórbidos).

Posteriormente, em 2014 Eisenberg et al. estudaram a relação entre IMC e RCQ e parâmetros seminais, em uma coorte de mais de 500 casais tentando estabelecer gestação natural.(155) Mais uma vez, os autores mostraram que homens obesos tinham chance 19 vezes maior de serem oligospermicos, quando

comparados homens de IMC normal. Aqui os autores também tentaram estabelecer relação entre atividade física e parâmetros seminais, e concluíram que grau de atividade não interfere na qualidade seminal.

As diferenças encontradas aqui neste trabalho entre o grupo controle e o grupo de pacientes obesos mais uma vez representam as peculiaridades da população estudada. Todos os pacientes incluídos no estudo são não somente obesos, mas também pacientes que sofrem com as consequências da obesidade mórbida. A prevalência de pacientes oligospérmicos e oligospérmicos graves foi bem superior ao grupo controle. Além disso, 3 pacientes foram identificados como portadores de azoospermia, sendo que o diagnóstico não era conhecido previamente cada um deles.

Apesar de ainda largamente utilizado para o diagnóstico inicial e definição de gravidade dos pacientes inférteis, o espermograma tem limitações. Como descrito previamente, este exame tem baixa capacidade de diferenciar pacientes férteis de inférteis, estimulando a pesquisa por novos marcadores de fertilidade. Neste contexto, a fragmentação do DNA espermático se estabeleceu como o exame mais promissor dentre todos aqueles que se concentram na função espermática. Já foi mostrado que o estudo da fragmentação do DNA espermático pode trazer diversas informações adicionais no manejo do casal infértil. Taxas elevadas de fragmentação dificultam gestação natural, e alguns autores já sugeriram que IFD acima de 30% pela técnica de SCSA reduz taxas de sucesso em inseminação intrauterina para próximo de zero.(156-158) Mesmo com os avanços nas técnicas de RA, já foi demonstrado que elevada fragmentação do DNA espermático pode ser prejudicial também em tratamentos de FIV, tornando

importante sua avaliação mesmo naqueles casais que já estão na linha final do tratamento da infertilidade.(156, 159)

A fisiopatologia da fragmentação de DNA tem seu pilar na produção de ROS.(113) Apesar de suas importantes funções em diversos mecanismos biológicos, o desequilíbrio entre ROS e capacidade antioxidante é muito prejudicial ao gameta masculino, devido à sua alta susceptibilidade às lesões causadas pelos radicais livres. ROS são capazes não somente de induzir fragmentação de DNA nos espermatozoides, mas podem também causar disfunção de sua membrana celular através de peroxidação lipídica, e prejudicar a função mitocondrial com consequente redução da motilidade espermática.(47, 160)

Diversas teorias tentam estabelecer a fisiopatologia do IFD elevado em pacientes obesos. Concentração de gordura na região pubiana, lipomatose escrotal e sedentarismo estão associados à elevação de temperatura escrotal, com consequente aumento da produção de ROS.(160) Adicionalmente, o estado pró-inflamatório constante presente nos pacientes obesos, relacionado principalmente à produção de adipocitocinas, também leva a aumento de radicais livres e desbalanço do equilíbrio entre ROS e capacidade antioxidante.(161)

Poucos autores, no entanto, estudaram a relação entre obesidade e elevação do IFD. Enquanto resultados de estudos de Kort et al. e Fariello et al. sugerem relação positiva entre IMC elevado e fragmentação do DNA espermático, Bandel et. Al não encontraram associação entre IFD e IMC em pacientes provenientes de 4 coortes europeias.(46-48) Neste estudo, todos os pacientes tinham 18 anos de idade, o que pode ter contribuído para a ausência de alterações identificadas. Por fim, a ausência de concordância entre os estudos com

relação a integridade da cromatina espermática sugere que há fatores ainda não identificados que podem estar presentes em alguns pacientes obesos, tais como comorbidades, sedentarismo e padrões de dieta, levando à elevação da fragmentação em alguns deles.(162) Em nossa população estudada, composta majoritariamente de pacientes muito obesos, encontramos IFD duas vezes maior nos pacientes portadores de obesidade. Nossos resultados sugerem que a obesidade está sim associada a IFD elevado, entretanto mais estudos são necessários para definir se sobrepeso ou obesidade grau I também cursam com aumento da fragmentação do DNA espermático.

O uso da cirurgia bariátrica na prática clínica cresceu exponencialmente nas últimas décadas. Em 1991, consenso resultante de conferência promovida pelo instituto nacional de saúde americano (em inglês: *National Institutes of Health* – NIH) pela primeira vez determinou práticas padrão que validaram o uso da cirurgia bariátrica para o tratamento da obesidade.(163) Até então a cirurgia bariátrica era considerada procedimento de alto risco, e seus benefícios não respaldavam seu uso fora de protocolos de pesquisa. Atualmente, evidências sugerem que os procedimentos de cirurgia bariátrica resultam em maior perda de peso e são mais eficazes em induzir remissão de diabetes mellitus tipo II que tratamentos não-cirúrgicos. Avaliações a longo-prazo de segurança, perfil de complicações e manutenção da perda de peso são tópicos ainda em aberto, que carecem de mais estudos.(164) Sabe-se, no entanto, que há diversas alterações metabólicas decorrentes destes procedimentos, alguns especificamente ligados a cada tipo de técnica utilizada. A DGYR, procedimento mais frequente neste estudo, está associada à redução de níveis de grelina, hormônio associado a regulação da saciedade e apetite.(165) Além disso, com a exclusão do duodeno do

trânsito intestinal, absorção de cálcio, folato, ferro, cobre e zinco são prejudicadas, e estas substâncias devem ser suplementadas. No presente estudo, todos os pacientes permaneceram em acompanhamento nutricional pós-operatório, recebendo adequada reposição de vitaminas e minerais.

Até o momento, diversos estudos tentaram estabelecer os efeitos da cirurgia bariátrica sobre parâmetros hormonais, análise seminal e função erétil. Resultados da metanálise publicada por Lee et al. em 2018 mostram que a cirurgia bariátrica tem potencial de elevar níveis séricos de testosterona total e livre, FSH, LH e SHBG, e de diminuir níveis de estradiol e prolactina.⁽⁷⁵⁾ Entretanto, a grande limitação desta análise consiste na grande heterogeneidade dos estudos incluídos, já que estes têm grande variabilidade de desenho, populações diferentes, compreendem diferentes tipos de cirurgia bariátrica e incluem diversos artigos com pequeno tamanho de amostra. Estas limitações são compatíveis com a dificuldade para realização de estudos randomizados envolvendo intervenções cirúrgicas. Os resultados apresentados aqui neste estudo são muito semelhantes, também com elevação significativa de testosterona total e livre, FSH e SHBG, e redução da prolactina. Adicionalmente, os efeitos descritos parecem ser duradouros. Em 2018, Pham et al. publicaram resultados de 5 anos de seguimento de pacientes randomizados para cirurgia ou tratamento clínico, mostrando que pacientes submetidos a cirurgia bariátrica apresentaram elevação da testosterona total e livre em 80 e 50%, respectivamente, enquanto pacientes não operados mostraram elevação da testosterona total em somente 10%, e redução da testosterona livre.⁽¹⁶⁶⁾ Além disso, estes efeitos citados foram mais evidentes em pacientes que mantiveram perda de peso maior que 15% (aumento de testosterona total de 210 vs. 86 ng/dL, $p = 0,040$).

O efeito esperado de melhora de parâmetros seminais após cirurgia bariátrica, no entanto, não foi observado aqui. Pacientes submetidos ao procedimento cirúrgico apresentaram importante queda da concentração seminal (mediana de 72,5 a 47 milhões/mL, $p = 0,0022$) e da quantidade total de espermatozoides ejaculados (mediana de 122,8 a 17 milhões, $p = 0,0017$). Análise de regressão linear também sugere que a diminuição da quantidade total de espermatozoides ejaculados correlacionou-se com a porcentagem de perda de peso. Nossos resultados vêm acrescentar mais incertezas aos resultados apresentados na literatura até o momento. Estudo de El Bardisi publicado em 2016 identificou, após gastrectomia vertical, retorno de espermatozoides ao ejaculado de 6 pacientes previamente azoospermicos. No mesmo estudo, dentre 19 pacientes oligospermicos antes da cirurgia, 17 melhoraram sua concentração seminal e 6 pacientes passaram a apresentar concentração de espermatozoides acima de 15 milhões/mL após a cirurgia.(69) A metanálise publicada por Lee et al. em 2018, após compilar dados de 3 estudos retrospectivos, não identificou alterações seminais nos pacientes operados.(69, 74, 75, 167) Entretanto, o mesmo estudo sugere tendência de piora de parâmetros seminais em subanálise contendo somente pacientes submetidos a DGYR, provenientes de duas séries de casos.(71, 72) Considerando que nossa amostra é composta majoritariamente de pacientes submetidos a DGYR, podemos supor que as alterações metabólicas e nutricionais são mais prejudiciais à espermatogênese que aquelas causadas por outras técnicas cirúrgicas. Entretanto, mais estudos e com maior número de pacientes são necessários para comprovar esta hipótese.

Estudo com desenho semelhante ao presente artigo foi o primeiro a tentar identificar variações da fragmentação do DNA espermático após cirurgia

bariátrica. Em 2017, Samavat et al. não identificaram alterações do IFD, aferido pela técnica de TUNEL, em 23 pacientes submetidos a DGYR, nos primeiros 6 meses de seguimento.(74) Em nossa avaliação, apesar de não ter sido possível identificar alteração da média do IFD (49,5 para 36,5%, $p = 0,0587$), houve melhora da integridade da cromatina espermática, com elevação significativa de espermatozoides classe I (não fragmentados, mediana de 12,5 para 30,5%, $p = 0,0049$), e queda também significativa de espermatozoides classe III (fragmentados, mediana de 41 para 23%, $p = 0,0155$).

Os resultados apresentados aqui são provavelmente decorrentes das alterações metabólicas resultantes da cirurgia bariátrica, e de sua evolução ao longo do tempo. Em 2009, Leichman et al. demonstraram que, nos primeiros 3 meses pós-operatórios, pacientes já apresentam queda da glicemia de jejum e de níveis de insulina, além de aumento da leptina sérica e normalização da resistência insulínica.(168) Conclui-se portanto, que boa parte das alterações metabólicas decorrentes da cirurgia bariátrica ocorre antes da perda de peso importante, já nas primeiras semanas ou até mesmo nos primeiros dias de pós-operatório.(169) Como citado anteriormente, a resistência insulínica pode reduzir níveis séricos de SHBG, aumentando a concentração de estradiol livre circulante. O *feedback* negativo exercido pelo estradiol livre gera, por conseguinte, diminuição da síntese FSH, LH, e consequentemente de testosterona.(32) Provavelmente o padrão apresentado pelos pacientes deste estudo em período pós-operatório, de melhora do padrão hormonal é decorrente destas alterações. Parâmetros seminais, no entanto, não acompanharam estes resultados. Isto provavelmente foi secundário a duas hipóteses. Primeiramente, sabe-se que o ciclo de espermatogênese completo dura aproximadamente 74 dias.(170) Portanto,

os 6 meses de seguimento pós-operatório podem não ter sido suficientes para que observemos repercussão na análise seminal. Além disso, os efeitos positivos da melhora do perfil hormonal podem ter sido contrabalanceados por deficiências nutricionais e pela perda de peso maciça ocorridas no pós-operatório.

A queda da fragmentação do DNA espermático, no entanto, caminha em sentido oposto à piora dos parâmetros seminais. A importante perda de peso, resultando em melhora do estado pró-inflamatório causado pela obesidade, provavelmente levou a redução de ROS e melhora da regulação da temperatura escrotal, reduzindo as agressões à cromatina espermática. Pesquisas futuras com aferição de ROS no plasma seminal, identificação de sua variação ao longo do tempo pós-operatório, e correlação com marcadores inflamatórios sistêmicos podem vir a estabelecer esta fisiopatologia.

Há evidências na literatura da associação entre obesidade e disfunção erétil. Além das diversas alterações hormonais já citadas, as comorbidades que geralmente acompanham a obesidade, como diabetes mellitus, HAS e hipercolesterolemia estão associadas à disfunção endotelial que faz parte da fisiopatologia da DE arteriogênica.(171, 172) Diversas medicações utilizadas no tratamento da HAS também estão associadas a DE.(173) Além disso, a obesidade mórbida está associada a diversos distúrbios como depressão e insatisfação com a imagem corporal, que também podem influenciar negativamente a vida sexual destes indivíduos.(174, 175) Por fim, estudos sugerem que a cirurgia bariátrica pode melhorar a qualidade da vida sexual de pacientes obesos. Em estudo publicado em 2016 por Aleid et al., pacientes com disfunção erétil pré-operatória apresentaram melhora na função erétil e no grau de satisfação no intercurso sexual

a partir do primeiro mês pós-operatório, alcançando níveis ainda melhores três meses após o procedimento.(176)

Entretanto, a população obesa incluída neste estudo não apresentou redução do escore IIEF-5 quando comparada aos controles férteis. O alto valor do IIQ no grupo de pacientes obesos sugere que o tamanho da amostra não foi suficiente para comparação adequada entre os grupos. Adicionalmente, não houve diferença significativa entre o valor do escore IIEF-5 na entrada e na reavaliação dos grupos. Não podemos, portanto, generalizar os resultados obtidos para a população geral.

Este estudo apresenta limitações que são características inerentes dos estudos não-randomizados, podendo limitar a generalização dos resultados obtidos devido a um viés de seleção dos indivíduos. Por exemplo, já foi demonstrado que pacientes portadores de infertilidade são mais propensos a participar de estudos que envolvem análise seminal.(177) No entanto, a baixa prevalência de obesidade mórbida na população exigiria elevado número de participantes para trazer resultados significativos em um estudo de coorte, e estudos randomizados envolvendo abordagens cirúrgicas são cada vez mais raros e de difícil justificativa ética.(178) Outro fator a ser discutido foi a seleção de IMC como marcador principal de obesidade. O uso deste índice vem sendo criticado recentemente, já que ele não consegue diferenciar massa muscular de excesso de adiposidade, especialmente em pacientes com baixo IMC, e não é marcador adequado de gordura visceral.(179-181) Atualmente há outros métodos disponíveis para determinação da obesidade, como avaliação do percentual de gordura por dobras cutâneas, absorciometria de raio-X de dupla energia (DEXA, do inglês *dual energy X-ray absorptiometry*) e bioimpedância elétrica.(182) No

entanto, todos esses métodos exigem a presença de avaliadores treinados, equipamentos de alto custo e que algumas vezes apresentam limitações de uso em pacientes superobesos. O tamanho do scanner utilizado no DEXA, por exemplo, pode ser inadequado para pacientes acima de 95 kg, gerando medidas subestimadas.(182) Além disso, técnicas de bioimpedância podem superestimar a avaliação da massa magra, devido ao aumento relativo da quantidade de água extracelular em pacientes obesos mórbidos, especialmente naqueles com maior porcentagem de gordura abdominal.(183) Adicionalmente, o uso limitado destas técnicas na prática clínica dificulta a padronização de valores de referência. Estudo recente publicado pelo departamento de gastroenterologia do HCFMUSP propôs a utilização de Índice de Adiposidade Corporal Modificado na avaliação de pacientes obesos mórbidos, após comparação com análise de bioimpedância elétrica.(184) No futuro, a padronização e validação de índices como este podem substituir o uso do IMC na prática clínica. Apesar disso, o uso do IMC é simples, tem baixo custo e com mínima variabilidade interobservador. Comparado com medidas diretas tem alta especificidade (0,9) para a determinação de obesidade.(185) Medidas de razão cintura-quadril podem ser mais específicas para a determinação de gordura visceral, mas têm alta correlação com o valor do IMC, e no presente estudo não apresentaram resultados diferentes dos obtidos com o uso do IMC. Além disso, RCQ tem baixa acurácia em pacientes obesos mórbidos.(186) Portanto, acreditamos que seu uso não interferiu para a validação dos resultados apresentados aqui.

A opção pelo seguimento dos pacientes por 6 meses no pós-operatório envolveu questões não somente fisiopatológicas, mas também logísticas. Constrangimentos inerentes a estudos com coleta de análise seminal dificultou o

seguimento e a aderência dos pacientes ao estudo, especialmente em uma população com pacientes obesos mórbidos. Pelo menos 10 pacientes foram excluídos da análise da qualidade seminal por não conseguirem fornecer amostra de sêmen, e diversos outros pacientes recusaram participação ao tomar conhecimento da necessidade deste exame. Pelo mesmo motivo, optamos pela coleta de somente uma amostra de sêmen por indivíduo. Adicionalmente, sabe-se que o nadir da perda de peso dos pacientes submetidos a cirurgia bariátrica fica próximo dos 18 meses após o procedimento.(187) Neste período, o perfil hormonal dos pacientes varia gradativamente, e diferentes achados poderiam ser obtidos nas diversas fases do pós-operatório. Além disso, em 2015, Santo et al. mostrou que sucesso na perda de peso pós-operatória e a manutenção desta estiveram ligadas a diferentes perfis hormonais pós-operatórios.(188) As alterações apresentadas aqui, portanto, são representativas de um período específico do pós-operatório, e podem variar em outros momentos de avaliação, especialmente após eventual reganho de peso. Além disso, podem haver diferentes populações de pacientes obesos, a depender da intensidade da perda de peso, com influência de hormônios como a grelina, por exemplo. Mais estudos são necessários para avaliar estas alterações propostas.

Por fim, de modo a não reduzir o tamanho da amostra disponível, optamos por não excluir da análise pacientes portadores de causas conhecidas de elevação de IFD e de piora de parâmetros seminais, varicocele e leucocitospermia. Pacientes portadores de varicocele foram mais frequentes no grupo de pacientes do grupo controle. Alguns estudos sugerem que, de fato, a varicocele é mais frequente em pacientes mais magros, provavelmente devido ao menor coxim gorduroso sobre o qual se apoiam os vasos gonadais, dificultando a drenagem

venosa dos testículos, especialmente do lado esquerdo.(189, 190) Portanto, mesmo que essa variável tenha afetado de alguma forma os indivíduos portadores, a retirada de seus efeitos aumentaria a diferença entre os grupos, e não o contrário. Leucocitospermia não foi diferente entre os grupos, em nenhuma das fases analisadas. Adicionalmente, ambas as variáveis foram incluídas nos modelos de análise multivariada, e não reduziram a significância estatística dos resultados obtidos.

Este estudo sugere que a obesidade grave tem profundas implicações sobre a saúde reprodutiva dos indivíduos, incluindo desbalanço de hormônios sexuais, alterações significativas dos parâmetros seminais e elevação da fragmentação do DNA espermático. Em muitos casos, o tratamento clínico da obesidade não é suficiente, e a cirurgia bariátrica vem trilhando seu caminho como método seguro e eficaz para a redução de peso e melhoria da qualidade de vida destes pacientes, de forma mais duradoura. Neste contexto, a relevância deste estudo é mostrar que as alterações hormonais promovidas pelo excesso de peso são rapidamente ajustadas após a cirurgia bariátrica. Em nossa amostra, no entanto, o procedimento cirúrgico não foi capaz de trazer benefícios aos parâmetros seminais clássicos, promovendo ate mesmo uma diminuição da concentração seminal e do número total de espermatozoides. Essas alterações encontradas sugerem a necessidade de uma adequada orientação aos pacientes previamente à realização da cirurgia bariátrica. O fato de termos observado queda do IFD no pós-operatório sugere que a correção do estado pró-inflamatório persistente na obesidade contribuiu de alguma forma para a qualidade seminal, mas, aos 6 meses de seguimento, isto ainda não foi suficiente para levar à melhoria de outros parâmetros seminais. Estudos futuros são necessários para avaliar se as alterações seminais persistem a

longo-prazo ou se, após período de estabilização da perda de peso e ajuste do suporte nutricional, ocorra uma inversão no caminho destas alterações, trazendo maior benefício a estes indivíduos.

6. CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

As conclusões deste estudo são:

1. Homens obesos apresentam maiores níveis séricos de estradiol, LH e FSH, e menores níveis séricos de testosterona total quando comparados a homens férteis eutróficos. Além disso, apresentam redução do volume ejaculado, concentração seminal, número total de espermatozoides no ejaculado, motilidade total, motilidade progressiva e percentual de espermatozoides com morfologia normal, e elevação do índice de fragmentação de DNA espermático.
2. Homens obesos submetidos à cirurgia bariátrica apresentam elevação dos valores de FSH, SHBG, testosterona total e testosterona livre, e redução dos níveis de prolactina sérica. Além disso, apresentam queda da concentração seminal, do número total de espermatozoides no ejaculado, e da fragmentação do DNA espermático.

7. ANEXOS

7 ANEXOS

Anexo A. Carta de aprovação da CAPPesq

Hospital das Clínicas da FMUSP Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq
PROJETO DE PESQUISA	
Título: ANÁLISE DA FRAGMENTAÇÃO DO DNA ESPERMÁTICO EM PACIENTES OBESOS MÓRBIDOS ANTES E APÓS SEREM SUBMETIDOS À CIRURGIA BARIÁTRICA.	
Pesquisador Responsável: Marcello Antonio Signorelli Cocuzza	Versão: 1
Pesquisador Executante: Guilherme Jacom Abdulmassih Wood	CAAE: 39428414.3.0000.0068
Co-autores: Bruno Camargo Tiseo, Hamilton de Martim	
Finalidade Acadêmica: Doutorado	
Orientador: : Marcello Antonio Signorelli Cocuzza	
Instituição: HCFMUSP	
Departamento: CIRURGIA	
PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP	
Registro on-line: 12884	
Número do Parecer: 932.231	
Data da Relatoria: 19/01/2015 – <i>ad-referendum</i>	
Apresentação do Projeto: trata-se de estudo prospectivo que avaliará a fragmentação de DNA espermático de pacientes obesos mórbidos, antes e após a operação bariátrica e em comparação a grupo controle de indivíduos sadios que aguardam vasectomia. Existe finalidade acadêmica de doutorado do aluno Guilherme Jacom Abdulmassih Wood sob orientação do Dr Marcello Cocuzza.	
Objetivo da Pesquisa: Verificar a qualidade espermática em pacientes obesos mórbidos e a influência da operação bariátrica nesses parâmetros ao longo do tempo, comparada a qualidade observada no esperma de uma população considerada normal.	
Avaliação dos Riscos e Benefícios: Riscos mínimos Benefício de avaliação urológica e detecção de alterações.	
Comentários e Considerações sobre a Pesquisa: A pesquisa é original e terá financiamento da FAPESP.	
Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória: O TCLE deverá contemplar em seu texto a apresentação do estudo aos indivíduos que cederão o esperma para controle (grupo que fará vasectomia e não é doente). No TCLE lê-se apenas "Para isto, convidamos o senhor a participar desta pesquisa, na qual colheremos informações suas, e dos seus sintomas através de consultas médicas normais. Além disso, utilizaremos informações dos seus exames colhidos normalmente para o seguimento da sua doença." O grupo de estudo (pacientes obesos) devem ser esclarecidos quanto ao número de coletas previstos e nos tempos. NO TCLE lê-se apenas "As consultas serão realizadas como habitualmente. A avaliação da função do espermatozóide será realizada com coleta do esperma em ambiente especialmente reservado para isto através de masturbação individual."	
Recomendações: Ajustes mínimos ao TCLE e anexar carta de concordância do Departamento de Gastroenterologia e verificar se a informação prestada no projeto está correta sobre o Departamento a que pertence o Ambulatório de Obesidade. No projeto lê-se "Ambulatório de Obesidade da Unidade de Cirurgia Bariátrica e Metabólica (Divisão de Cirurgia do Aparelho Digestivo e Coloproctologia do Departamento de Cirurgia do H.C.F.M.U.S.P)".	
<hr/>	
Rua Dr. Ovídio Pires de Campos, 225 - Prédio da Administração - 5º andar CEP 05403-010 - São Paulo - SP. 55 11 2661-7585 - 55 11 2661-6442 ramais: 16, 17, 18 cappesq.adm@hc.fm.usp.br

Hospital das Clínicas da FMUSP

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações: Ajustes mínimos ao TCLE e solicitação de carta de anuência do Departamento de Gastroenterologia, que não impedem a aprovação do projeto. Favor inserir aperfeiçoamento do TCLE e carta de anuência.

Situação do Parecer: Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP: Não

Considerações Finais a critério do CEP: Em conformidade com a Resolução CNS nº 466/12 – cabe ao pesquisador: **a)** desenvolver o projeto conforme delineado; **b)** elaborar e apresentar relatórios parciais e final; **c)** apresentar dados solicitados pelo CEP, a qualquer momento; **d)** manter em arquivo sob sua guarda, por 5 anos da pesquisa, contendo fichas individuais e todos os demais documentos recomendados pelo CEP; **e)** encaminhar os resultados para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico participante do projeto; **f)** justificar perante ao CEP interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados.

São Paulo, 19 de janeiro de 2015

Prof. Dr. Joel Faintuch

Vice - Coordenador

Comissão de Ética para Análise de
Projetos de Pesquisa – CAPPesq

Anexo B. Carta de concessão da CAPES – Bolsa para Doutorado Sanduíche
no Exterior realizado no *Massachusetts General Hospital Fertility Center*.

Período: agosto de 2015 a janeiro de 2016.

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
SBN, Quadra 2, Lote 06, Bloco L
70040-020 - Brasília, DF
Brasil

Ilmo(a). Sr(a).
GUILHERME JACOM ABDULMASSIH WOOD
RUA JOÃO MOURA 956 AP. 101
PINHEIROS
SÃO PAULO-SP
05412002
BRASIL

Brasília, 23 de Junho de 2015
Processo: BEX 6709/15-0

Prezado(a) Senhor(a),

A CAPES aprovou a sua solicitação de apoio para **Estágio de Doutorando no exterior** nos seguintes termos:

- Até 6 mensalidades de US\$ 1.300,00 no período de Agosto/2015 a Janeiro/2016, observado o seguinte:
 - a) o valor integral de 3 (três) mensalidades será pago, antecipadamente, em reais, quando da implantação de sua bolsa, em sua conta corrente no Brasil - juntamente com o(s) auxílio(s) que lhe foi(foram) concedido(s);
 - b) o primeiro pagamento a ser realizado no exterior terá seu valor definido de acordo com a data de sua chegada ao país de destino, sendo descontado o correspondente aos dias em que lá não permaneceu. O valor dos dias descontados nessa mensalidade não será pago ou compensado ao término da vigência de sua bolsa;
 - c) caso já seja beneficiário de bolsa, cujo recurso seja proveniente do Tesouro Nacional, o pagamento (tanto no Brasil como no exterior) de qualquer das mensalidades de sua bolsa ora concedida pela Capes somente poderá ser efetuado depois do envio, para seu processo online, da cópia do comprovante de suspensão ou de cancelamento de sua bolsa no país, emitido pela instituição que a concedeu. Essa suspensão ou cancelamento deve vigorar a partir do mês de início de sua bolsa no exterior.
- Auxílio Instalação de US\$ 1.300,00 para o período de concessão da bolsa.
- Auxílio Seguro Saúde de US\$ 540,00 para o período de concessão da bolsa.
- Auxílio Deslocamento de US\$ 1.604,00 para suas despesas de ida para o exterior e retorno para o Brasil, a ser pago de uma só vez, quando da implantação de sua bolsa.
- Adicional no valor de US\$ 400,00 a ser somado nas 6 parcelas previstas, como ajuda de custo extra fornecida pelo governo brasileiro em função da localidade.

Trecho aprovado:
BRASIL(BR)/ESTADOS UNIDOS(US)/BRASIL(BR)

Os benefícios concedidos estão vinculados ao tempo da efetiva permanência no exterior, dentro do período de vigência da bolsa.

As **Orientações para Bolsistas de Estágio de Doutorando no Exterior** estão disponíveis no endereço:
<http://www.capes.gov.br/bolsas/bolsas-no-exterior/bolsistas-ativos/estagio-de-doutorando>.

CAPES/CCE - SBN, Quadra 2, Lote 06, Bloco L, 1º SS - 70040-020 - Brasília, DF - Fone: 0800 616161

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
SBN, Quadra 2, Lote 06, Bloco L
70040-020 - Brasília, DF
Brasil

Segue anexo o **Termo de Compromisso** que, após sua leitura, deve ser assinado, com uma via devolvida à CAPES por correio tradicional e outra enviada digitalizada por meio do processo eletrônico.

As informações sobre dados bancários para pagamentos no Brasil e atualizações cadastrais deverão ser fornecidas no link "formulários on-line" na página web do PDSE no site da Capes.

No caso de servidor público o procedimento para obtenção da **autorização de afastamento do país**, junto à instituição com a qual mantém vínculo empregatício, é de sua responsabilidade. Comunique à sua Instituição que o ato de autorização para seu afastamento, deve constar o **ônus para a CAPES**, conforme **Decreto 91.800 de 18/10/1985**.

Informações sobre a bolsa concedida poderão ser prestadas a V. Sa. recomenda-se que quaisquer consultas sejam realizadas, preferencialmente, por escrito via meios eletrônicos.

Atenciosamente,

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Vanessa', is written over the printed name.

VANESSA FERNANDES DE ARAÚJO

COORDENAÇÃO DE CANDIDATURAS A BOLSAS E AUXÍLIOS NO EXTERIOR

Esta assinatura independe de reconhecimento de firma, por se tratar de documento público - Art. 19, Inciso II - Constituição Federal do Brasil.

John Jackie Gonçalves Oliveira
Coordenador de Projetos
Substituto
Portaria nº 126 - DOU - 16/07/2014
CAPES/MEC

Anexo C. Termo de consentimento livre e esclarecido.

1

**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP**

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME:
- DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº: SEXO: .M ☐ F ☐
- DATA NASCIMENTO:/...../.....
- ENDEREÇO Nº APTO:
- BAIRRO: CIDADE:
- CEP: TELEFONE: DDD (.....)
2. RESPONSÁVEL LEGAL
- NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)
- DOCUMENTO DE IDENTIDADE: SEXO: M ☐ F ☐
- DATA NASCIMENTO:/...../.....
- ENDEREÇO: Nº APTO:
- BAIRRO: CIDADE:
- CEP: TELEFONE: DDD (.....)

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: *"Análise da fragmentação do DNA espermático em pacientes obesos mórbidos antes e após serem submetidos à cirurgia bariátrica."*

PESQUISADORES: Dr. Marcello Cocuzzi e Dr. Guilherme Wood

CARGO/FUNÇÃO: Médico Responsável pelo Centro de Reprodução Humana do ICHC-FMUSP e aluno da pós-graduação da FMUSP.

INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 94.726 / Nº 129.735

UNIDADE DO HCFMUSP: Centro de Reprodução Humana (HC-FMUSP)

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO ☒ RISCO MÉDIO ☐

RISCO BAIXO ☐ RISCO MAIOR ☐

4. DURAÇÃO DA PESQUISA : 30 meses (novembro de 2016 a maio de 2019)

**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP**

1 – Desenho do estudo e objetivo(s): Estamos pesquisando as alterações que a obesidade é capaz de causar nos espermatozoides.

2 – Para isto, convidamos o senhor a participar desta pesquisa, na qual colheremos informações suas, e dos seus sintomas através de consultas médicas normais. Além disso, utilizaremos informações dos seus exames colhidos normalmente para o seguimento da sua doença. Realizaremos uma coleta de espermatozoides no nosso centro de reprodução para avaliar a função dos espermatozoides.

3 – As consultas serão realizadas como habitualmente. A avaliação da função do espermatozoide será realizada com coleta do espermatozoide em ambiente especialmente reservado para isto através de masturbação individual.

4 – Haverá o desconforto da coleta de espermatozoide, porém esta coleta não traz risco a sua saúde nem desconforto físico.

5 – **Benefícios para o participante: não há benefício direto para o participante. Entretanto, participando da pesquisa você poderá saber se possui alguma alteração na função dos seus testículos e na função dos espermatozoides.**

6 – Relação de procedimentos alternativos que possam ser vantajosos, pelos quais o paciente pode optar: Não há procedimentos envolvidos.

7 – Garantia de acesso: em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. Os principais investigadores são o **Dr. Marcello Cocuzzi e Guilherme Wood**, e podem ser encontrados no endereço: **Instituto Central do Hospital das Clínicas – FMUSP, Av. Dr. Enéas de Carvalho, 255, 7º Andar - Telefone: 2661-8080**. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (CEP-HC-FMUSP): **Rua Ovidio Pires de Campos, 225 – Prédio da Administração – 5º andar - Cerqueira César - São Paulo - SP - CEP: 05403-010 / Tel: 2661-6442 ramais 16, 17, 18** E-mail: cappesq.adm@hc.fm.usp.br

8 – É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar da pesquisa;

9 – Direito de confidencialidade – As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgada a identificação de nenhum participante do estudo;

10 – Direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas, quando em estudos abertos, ou de resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores;

11 – Despesas e compensações: não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo: “Análise da fragmentação do DNA espermático em pacientes obesos mórbidos antes e após serem submetidos à cirurgia bariátrica.”.

Eu discuti com Guilherme Wood sobre a minha decisão em participar desse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo.

Assinatura do sujeito da pesquisa

Data: ____ / ____ / ____

Assinatura da testemunha

Data: ____ / ____ / ____

para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

(Somente para o responsável do projeto)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Assinatura do responsável pelo estudo

Data: ____ / ____ / ____

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Group ECW. Social determinants of human reproduction. Human reproduction. 2001;16(7):1518-26.
2. Greenhall E, Vessey M. The prevalence of subfertility: a review of the current confusion and a report of two new studies. Fertility and sterility. 1990;54(6):978-83.
3. Anderson JE, Farr SL, Jamieson DJ, Warner L, Macaluso M. Infertility services reported by men in the United States: national survey data. Fertility and sterility. 2009;91(6):2466-70.
4. Practice Committee of American Society for Reproductive M. Definitions of infertility and recurrent pregnancy loss: a committee opinion. Fertility and sterility. 2013;99(1):63.
5. Honig SC, Lipshultz LI, Jarow J. Significant medical pathology uncovered by a comprehensive male infertility evaluation. Fertility and sterility. 1994;62(5):1028-34.
6. Devroey P, Liu J, Nagy Z, Tournaye H, Silber SJ, Van Steirteghem AC. Normal fertilization of human oocytes after testicular sperm extraction and intracytoplasmic sperm injection. Fertility and sterility. 1994;62(3):639-41.
7. Silber SJ, Van Steirteghem AC, Liu J, Nagy Z, Tournaye H, Devroey P. High fertilization and pregnancy rate after intracytoplasmic sperm injection with spermatozoa obtained from testicle biopsy. Human reproduction. 1995;10(1):148-52.
8. Shefi S, Turek PJ. Definition and current evaluation of subfertile men. International braz j urol : official journal of the Brazilian Society of Urology. 2006;32(4):385-97.

9. Thonneau P, Marchand S, Tallec A, Ferial ML, Ducot B, Lansac J, et al. Incidence and main causes of infertility in a resident population (1,850,000) of three French regions (1988-1989). *Human reproduction*. 1991;6(6):811-6.
10. MacLeod J. Human male infertility. *Obstet Gynecol Surv*. 1971;26(5):335-51.
11. Irvine DS. Epidemiology and aetiology of male infertility. *Human reproduction*. 1998;13 Suppl 1:33-44.
12. Practice Committee of the American Society for Reproductive M. Diagnostic evaluation of the infertile male: a committee opinion. *Fertility and sterility*. 2015;103(3):e18-25.
13. Esteves SC. A clinical appraisal of the genetic basis in unexplained male infertility. *J Hum Reprod Sci*. 2013;6(3):176-82.
14. Group ECW. Economic aspects of infertility care: a challenge for researchers and clinicians. *Human reproduction*. 2015;30(10):2243-8.
15. Ng M, Fleming T, Robinson M, Thomson B, Graetz N, Margono C, et al. Global, regional, and national prevalence of overweight and obesity in children and adults during 1980-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet*. 2014;384(9945):766-81.
16. Astrup A, Finer N. Redefining type 2 diabetes: 'diabesity' or 'obesity dependent diabetes mellitus'? *Obes Rev*. 2000;1(2):57-9.
17. Jeffery RW, Utter J. The changing environment and population obesity in the United States. *Obes Res*. 2003;11 Suppl:12S-22S.
18. Swan SH, Elkin EP, Fenster L. The question of declining sperm density revisited: an analysis of 101 studies published 1934-1996. *Environmental health perspectives*. 2000;108(10):961-6.

19. Auger J, Kunstmann JM, Czyglik F, Jouannet P. Decline in semen quality among fertile men in Paris during the past 20 years. *The New England journal of medicine*. 1995;332(5):281-5.
20. Irvine S, Cawood E, Richardson D, MacDonald E, Aitken J. Evidence of deteriorating semen quality in the United Kingdom: birth cohort study in 577 men in Scotland over 11 years. *BMJ*. 1996;312(7029):467-71.
21. Van Waelegheem K, De Clercq N, Vermeulen L, Schoonjans F, Comhaire F. Deterioration of sperm quality in young healthy Belgian men. *Human reproduction*. 1996;11(2):325-9.
22. Carlsen E, Giwercman A, Keiding N, Skakkebaek NE. Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years. *BMJ*. 1992;305(6854):609-13.
23. Johnson SL, Dunleavy J, Gemmell NJ, Nakagawa S. Consistent age-dependent declines in human semen quality: a systematic review and meta-analysis. *Ageing Res Rev*. 2015;19:22-33.
24. Best D, Bhattacharya S. Obesity and fertility. *Horm Mol Biol Clin Investig*. 2015;24(1):5-10.
25. Du Plessis SS, Cabler S, McAlister DA, Sabanegh E, Agarwal A. The effect of obesity on sperm disorders and male infertility. *Nat Rev Urol*. 2010;7(3):153-61.
26. Schlegel PN. Aromatase inhibitors for male infertility. *Fertility and sterility*. 2012;98(6):1359-62.
27. Green ED, Maffei M, Braden VV, Proenca R, DeSilva U, Zhang Y, et al. The human obese (OB) gene: RNA expression pattern and mapping on the physical, cytogenetic, and genetic maps of chromosome 7. *Genome Res*. 1995;5(1):5-12.
28. Wozniak SE, Gee LL, Wachtel MS, Frezza EE. Adipose tissue: the new endocrine organ? A review article. *Dig Dis Sci*. 2009;54(9):1847-56.

29. Isidori AM, Caprio M, Strollo F, Moretti C, Frajese G, Isidori A, et al. Leptin and androgens in male obesity: evidence for leptin contribution to reduced androgen levels. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 1999;84(10):3673-80.
30. Joep T, Lammert A, Kratzsch J, Paasch U, Glander HJ. Leptin and leptin receptor in human seminal plasma and in human spermatozoa. *International journal of andrology*. 2003;26(6):335-41.
31. Hofny ER, Ali ME, Abdel-Hafez HZ, Kamal Eel D, Mohamed EE, Abd El-Azeem HG, et al. Semen parameters and hormonal profile in obese fertile and infertile males. *Fertility and sterility*. 2010;94(2):581-4.
32. Lima N, Cavaliere H, Knobel M, Halpern A, Medeiros-Neto G. Decreased androgen levels in massively obese men may be associated with impaired function of the gonadostat. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 2000;24(11):1433-7.
33. Jensen TK, Andersson AM, Jorgensen N, Andersen AG, Carlsen E, Petersen JH, et al. Body mass index in relation to semen quality and reproductive hormones among 1,558 Danish men. *Fertility and sterility*. 2004;82(4):863-70.
34. Jarow JP, Kirkland J, Koritnik DR, Cefalu WT. Effect of obesity and fertility status on sex steroid levels in men. *Urology*. 1993;42(2):171-4.
35. Luboshitzky R, Lavie L, Shen-Orr Z, Herer P. Altered luteinizing hormone and testosterone secretion in middle-aged obese men with obstructive sleep apnea. *Obes Res*. 2005;13(4):780-6.
36. Hjollund NH, Bonde JP, Jensen TK, Olsen J. Diurnal scrotal skin temperature and semen quality. The Danish First Pregnancy Planner Study Team. *International journal of andrology*. 2000;23(5):309-18.
37. Magnusdottir EV, Thorsteinsson T, Thorsteinsdottir S, Heimisdottir M, Olafsdottir K. Persistent organochlorines, sedentary occupation, obesity and human male subfertility. *Human reproduction*. 2005;20(1):208-15.

38. Sallmen M, Sandler DP, Hoppin JA, Blair A, Baird DD. Reduced fertility among overweight and obese men. *Epidemiology*. 2006;17(5):520-3.
39. Nguyen RH, Wilcox AJ, Skjaerven R, Baird DD. Men's body mass index and infertility. *Human reproduction*. 2007;22(9):2488-93.
40. Ramlau-Hansen CH, Thulstrup AM, Nohr EA, Bonde JP, Sorensen TI, Olsen J. Subfecundity in overweight and obese couples. *Human reproduction*. 2007;22(6):1634-7.
41. Aggerholm AS, Thulstrup AM, Toft G, Ramlau-Hansen CH, Bonde JP. Is overweight a risk factor for reduced semen quality and altered serum sex hormone profile? *Fertility and sterility*. 2008;90(3):619-26.
42. Duits FH, van Wely M, van der Veen F, Gianotten J. Healthy overweight male partners of subfertile couples should not worry about their semen quality. *Fertility and sterility*. 2010;94(4):1356-9.
43. Paasch U, Grunewald S, Kratzsch J, Glander HJ. Obesity and age affect male fertility potential. *Fertility and sterility*. 2010;94(7):2898-901.
44. MacDonald AA, Herbison GP, Showell M, Farquhar CM. The impact of body mass index on semen parameters and reproductive hormones in human males: a systematic review with meta-analysis. *Human reproduction update*. 2010;16(3):293-311.
45. Sermondade N, Faure C, Fezeu L, Shayeb AG, Bonde JP, Jensen TK, et al. BMI in relation to sperm count: an updated systematic review and collaborative meta-analysis. *Human reproduction update*. 2013;19(3):221-31.
46. Kort HI, Massey JB, Elsner CW, Mitchell-Leef D, Shapiro DB, Witt MA, et al. Impact of body mass index values on sperm quantity and quality. *Journal of andrology*. 2006;27(3):450-2.

47. Fariello RM, Pariz JR, Spaine DM, Cedenho AP, Bertolla RP, Fraietta R. Association between obesity and alteration of sperm DNA integrity and mitochondrial activity. *BJU international*. 2012;110(6):863-7.
48. Bandel I, Bungum M, Richtoff J, Malm J, Axelsson J, Pedersen HS, et al. No association between body mass index and sperm DNA integrity. *Human reproduction*. 2015;30(7):1704-13.
49. Campbell JM, Lane M, Owens JA, Bakos HW. Paternal obesity negatively affects male fertility and assisted reproduction outcomes: a systematic review and meta-analysis. *Reprod Biomed Online*. 2015;31(5):593-604.
50. Wu FC, Tajar A, Pye SR, Silman AJ, Finn JD, O'Neill TW, et al. Hypothalamic-pituitary-testicular axis disruptions in older men are differentially linked to age and modifiable risk factors: the European Male Aging Study. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2008;93(7):2737-45.
51. Derby CA, Mohr BA, Goldstein I, Feldman HA, Johannes CB, McKinlay JB. Modifiable risk factors and erectile dysfunction: can lifestyle changes modify risk? *Urology*. 2000;56(2):302-6.
52. Feldman HA, Johannes CB, Derby CA, Kleinman KP, Mohr BA, Araujo AB, et al. Erectile dysfunction and coronary risk factors: prospective results from the Massachusetts male aging study. *Prev Med*. 2000;30(4):328-38.
53. Bacon CG, Mittleman MA, Kawachi I, Giovannucci E, Glasser DB, Rimm EB. A prospective study of risk factors for erectile dysfunction. *The Journal of urology*. 2006;176(1):217-21.
54. Cheng JY, Ng EM. Body mass index, physical activity and erectile dysfunction: an U-shaped relationship from population-based study. *Int J Obes (Lond)*. 2007;31(10):1571-8.

55. Keltz J, Zapantis A, Jindal SK, Lieman HJ, Santoro N, Polotsky AJ. Overweight men: clinical pregnancy after ART is decreased in IVF but not in ICSI cycles. *Journal of assisted reproduction and genetics*. 2010;27(9-10):539-44.
56. Bakos HW, Henshaw RC, Mitchell M, Lane M. Paternal body mass index is associated with decreased blastocyst development and reduced live birth rates following assisted reproductive technology. *Fertility and sterility*. 2011;95(5):1700-4.
57. Niskanen L, Laaksonen DE, Punnonen K, Mustajoki P, Kaukua J, Rissanen A. Changes in sex hormone-binding globulin and testosterone during weight loss and weight maintenance in abdominally obese men with the metabolic syndrome. *Diabetes Obes Metab*. 2004;6(3):208-15.
58. Hakonsen LB, Thulstrup AM, Aggerholm AS, Olsen J, Bonde JP, Andersen CY, et al. Does weight loss improve semen quality and reproductive hormones? Results from a cohort of severely obese men. *Reprod Health*. 2011;8:24.
59. Esposito K, Giugliano F, Di Palo C, Giugliano G, Marfella R, D'Andrea F, et al. Effect of lifestyle changes on erectile dysfunction in obese men: a randomized controlled trial. *JAMA : the journal of the American Medical Association*. 2004;291(24):2978-84.
60. Chang SH, Stoll CR, Colditz GA. Cost-effectiveness of bariatric surgery: should it be universally available? *Maturitas*. 2011;69(3):230-8.
61. McTigue KM, Harris R, Hemphill B, Lux L, Sutton S, Bunton AJ, et al. Screening and interventions for obesity in adults: summary of the evidence for the U.S. Preventive Services Task Force. *Ann Intern Med*. 2003;139(11):933-49.
62. Chang SH, Stoll CR, Song J, Varela JE, Eagon CJ, Colditz GA. The effectiveness and risks of bariatric surgery: an updated systematic review and meta-analysis, 2003-2012. *JAMA Surg*. 2014;149(3):275-87.

63. Christou NV, Sampalis JS, Liberman M, Look D, Auger S, McLean AP, et al. Surgery decreases long-term mortality, morbidity, and health care use in morbidly obese patients. *Ann Surg*. 2004;240(3):416-23; discussion 23-4.
64. Marsk R, Naslund E, Freedman J, Tynelius P, Rasmussen F. Bariatric surgery reduces mortality in Swedish men. *The British journal of surgery*. 2010;97(6):877-83.
65. Reis LO, Favaro WJ, Barreiro GC, de Oliveira LC, Chaim EA, Fregonesi A, et al. Erectile dysfunction and hormonal imbalance in morbidly obese male is reversed after gastric bypass surgery: a prospective randomized controlled trial. *International journal of andrology*. 2010;33(5):736-44.
66. Bastounis EA, Karayiannakis AJ, Syrigos K, Zbar A, Makri GG, Alexiou D. Sex hormone changes in morbidly obese patients after vertical banded gastroplasty. *Eur Surg Res*. 1998;30(1):43-7.
67. Globerman H, Shen-Orr Z, Karnieli E, Aloni Y, Charuzi I. Inhibin B in men with severe obesity and after weight reduction following gastroplasty. *Endocr Res*. 2005;31(1):17-26.
68. Janik MR, Bielecka I, Kwiatkowski A, Janik PE, Drazba T, Bujok J, et al. Cross-sectional study of male sexual function in bariatric patients. *Wideochir Inne Tech Maloinwazyjne*. 2016;11(3):171-7.
69. El Bardisi H, Majzoub A, Arafa M, AlMalki A, Al Said S, Khalafalla K, et al. Effect of bariatric surgery on semen parameters and sex hormone concentrations: a prospective study. *Reprod Biomed Online*. 2016;33(5):606-11.
70. Boonchaya-Anant P, Laichuthai N, Suwannasrisuk P, Hounngam N, Udomsawaengsup S, Snabboon T. Changes in Testosterone Levels and Sex Hormone-Binding Globulin Levels in Extremely Obese Men after Bariatric Surgery. *Int J Endocrinol*. 2016;2016:1416503.

71. di Frega AS, Dale B, Di Matteo L, Wilding M. Secondary male factor infertility after Roux-en-Y gastric bypass for morbid obesity: case report. *Human reproduction*. 2005;20(4):997-8.
72. Sermondade N, Massin N, Boitrelle F, Pfeffer J, Eustache F, Sifer C, et al. Sperm parameters and male fertility after bariatric surgery: three case series. *Reprod Biomed Online*. 2012;24(2):206-10.
73. Reis LO, Zani EL, Saad RD, Chaim EA, de Oliveira LC, Fregonesi A. Bariatric surgery does not interfere with sperm quality--a preliminary long-term study. *Reprod Sci*. 2012;19(10):1057-62.
74. Samavat J, Cantini G, Lotti F, Di Franco A, Tamburrino L, Degl'Innocenti S, et al. Massive Weight Loss Obtained by Bariatric Surgery Affects Semen Quality in Morbid Male Obesity: a Preliminary Prospective Double-Armed Study. *Obes Surg*. 2018;28(1):69-76.
75. Lee Y, Dang JT, Switzer N, Yu J, Tian C, Birch DW, et al. Impact of Bariatric Surgery on Male Sex Hormones and Sperm Quality: a Systematic Review and Meta-Analysis. *Obes Surg*. 2018.
76. Guzick DS, Overstreet JW, Factor-Litvak P, Brazil CK, Nakajima ST, Coutifaris C, et al. Sperm morphology, motility, and concentration in fertile and infertile men. *The New England journal of medicine*. 2001;345(19):1388-93.
77. World Health Organization. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. 5th ed. Geneva: World Health Organization; 2010. xiv, 271 p. p.
78. van der Steeg JW, Steures P, Eijkemans MJ, JD FH, Hompes PG, Kremer JA, et al. Role of semen analysis in subfertile couples. *Fertility and sterility*. 2011;95(3):1013-9.

79. Greenberg SH, Lipshultz LI, Wein AJ. Experience with 425 subfertile male patients. *J Urol*. 1978;119(4):507-10.
80. Huszar G, Sbracia M, Vigue L, Miller DJ, Shur BD. Sperm plasma membrane remodeling during spermiogenetic maturation in men: relationship among plasma membrane beta 1,4-galactosyltransferase, cytoplasmic creatine phosphokinase, and creatine phosphokinase isoform ratios. *Biology of reproduction*. 1997;56(4):1020-4.
81. Aitken RJ, Krausz C. Oxidative stress, DNA damage and the Y chromosome. *Reproduction*. 2001;122(4):497-506.
82. Aitken RJ, Koopman P, Lewis SE. Seeds of concern. *Nature*. 2004;432(7013):48-52.
83. Sharma RK, Agarwal A. Role of reactive oxygen species in male infertility. *Urology*. 1996;48(6):835-50.
84. Aitken RJ, Sawyer D. The human spermatozoon--not waving but drowning. *Adv Exp Med Biol*. 2003;518:85-98.
85. Miesel R, Drzejczak PJ, Kurpisz M. Oxidative stress during the interaction of gametes. *Biology of reproduction*. 1993;49(5):918-23.
86. Aitken RJ, Best FS, Richardson DW, Djahanbakhch O, Lees MM. The correlates of fertilizing capacity in normal fertile men. *Fertil Steril*. 1982;38(1):68-76.
87. Aitken RJ, Best FS, Richardson DW, Djahanbakhch O, Mortimer D, Templeton AA, et al. An analysis of sperm function in cases of unexplained infertility: conventional criteria, movement characteristics, and fertilizing capacity. *Fertil Steril*. 1982;38(2):212-21.

88. Lundin K, Soderlund B, Hamberger L. The relationship between sperm morphology and rates of fertilization, pregnancy and spontaneous abortion in an in-vitro fertilization/intracytoplasmic sperm injection programme. *Human reproduction* (Oxford, England). 1997;12(12):2676-81.
89. Hallak J, Sharma RK, Pasqualotto FF, Ranganathan P, Thomas AJ, Jr., Agarwal A. Creatine kinase as an indicator of sperm quality and maturity in men with oligospermia. *Urology*. 2001;58(3):446-51.
90. Siciliano L, Tarantino P, Longobardi F, Rago V, De Stefano C, Carpino A. Impaired seminal antioxidant capacity in human semen with hyperviscosity or oligoasthenozoospermia. *Journal of andrology*. 2001;22(5):798-803.
91. Agarwal A, Sharma RK, Nallella KP, Thomas AJ, Jr., Alvarez JG, Sikka SC. Reactive oxygen species as an independent marker of male factor infertility. *Fertil Steril*. 2006;86(4):878-85.
92. Alvarez JG, Touchstone JC, Blasco L, Storey BT. Spontaneous lipid peroxidation and production of hydrogen peroxide and superoxide in human spermatozoa. Superoxide dismutase as major enzyme protectant against oxygen toxicity. *Journal of andrology*. 1987;8(5):338-48.
93. Yanagimachi R, Yanagimachi H, Rogers BJ. The use of zona-free animal ova as a test-system for the assessment of the fertilizing capacity of human spermatozoa. *Biology of reproduction*. 1976;15(4):471-6.
94. Coddington CC, Franken DR, Burkman LJ, Oosthuizen WT, Kruger T, Hodgen GD. Functional aspects of human sperm binding to the zona pellucida using the hemizona assay. *Journal of andrology*. 1991;12(1):1-8.
95. de Lamirande E, Gagnon C. Human sperm hyperactivation and capacitation as parts of an oxidative process. *Free Radic Biol Med*. 1993;14(2):157-66.

96. Burrows PJ, Schrepferman CG, Lipshultz LI. Comprehensive office evaluation in the new millennium. *The Urologic clinics of North America*. 2002;29(4):873-94.
97. Evenson DP, Jost LK, Marshall D, Zinaman MJ, Clegg E, Purvis K, et al. Utility of the sperm chromatin structure assay as a diagnostic and prognostic tool in the human fertility clinic. *Human reproduction (Oxford, England)*. 1999;14(4):1039-49.
98. de Lamirande E, Gagnon C. Impact of reactive oxygen species on spermatozoa: a balancing act between beneficial and detrimental effects. *Human reproduction (Oxford, England)*. 1995;10 Suppl 1:15-21.
99. Padron OF, Brackett NL, Sharma RK, Lynne CM, Thomas AJ, Jr., Agarwal A. Seminal reactive oxygen species and sperm motility and morphology in men with spinal cord injury. *Fertil Steril*. 1997;67(6):1115-20.
100. Aitken RJ. The Amoroso Lecture. The human spermatozoon--a cell in crisis? *J Reprod Fertil*. 1999;115(1):1-7.
101. Lewis SE, Boyle PM, McKinney KA, Young IS, Thompson W. Total antioxidant capacity of seminal plasma is different in fertile and infertile men. *Fertility and sterility*. 1995;64(4):868-70.
102. Sies H. Strategies of antioxidant defense. *Eur J Biochem*. 1993;215(2):213-9.
103. Agarwal A, Prabakaran SA. Mechanism, measurement, and prevention of oxidative stress in male reproductive physiology. *Indian J Exp Biol*. 2005;43(11):963-74.
104. Sanocka D, Kurpisz M. Reactive oxygen species and sperm cells. *Reprod Biol Endocrinol*. 2004;2:12.

105. Jones R, Mann T, Sherins R. Peroxidative breakdown of phospholipids in human spermatozoa, spermicidal properties of fatty acid peroxides, and protective action of seminal plasma. *Fertil Steril*. 1979;31(5):531-7.
106. Nagakawa Y, Williams GM, Zheng Q, Tsuchida A, Aoki T, Montgomery RA, et al. Oxidative mitochondrial DNA damage and deletion in hepatocytes of rejecting liver allografts in rats: role of TNF-alpha. *Hepatology*. 2005;42(1):208-15.
107. Ahmadi A, Ng SC. Fertilizing ability of DNA-damaged spermatozoa. *The Journal of experimental zoology*. 1999;284(6):696-704.
108. Balhorn R. A model for the structure of chromatin in mammalian sperm. *The Journal of cell biology*. 1982;93(2):298-305.
109. Carrell DT, Liu L. Altered protamine 2 expression is uncommon in donors of known fertility, but common among men with poor fertilizing capacity, and may reflect other abnormalities of spermiogenesis. *Journal of andrology*. 2001;22(4):604-10.
110. Sakkas D, Seli E, Bizzaro D, Tarozzi N, Manicardi GC. Abnormal spermatozoa in the ejaculate: abortive apoptosis and faulty nuclear remodelling during spermatogenesis. *Reproductive biomedicine online*. 2003;7(4):428-32.
111. Singh NP, Muller CH, Berger RE. Effects of age on DNA double-strand breaks and apoptosis in human sperm. *Fertility and sterility*. 2003;80(6):1420-30.
112. Zini A, de Lamirande E, Gagnon C. Reactive oxygen species in semen of infertile patients: levels of superoxide dismutase- and catalase-like activities in seminal plasma and spermatozoa. *International journal of andrology*. 1993;16(3):183-8.
113. Cocuzza M, Sikka SC, Athayde KS, Agarwal A. Clinical relevance of oxidative stress and sperm chromatin damage in male infertility: an evidence based

analysis. *International braz j urol : official journal of the Brazilian Society of Urology*. 2007;33(5):603-21.

114. Xing W, Krishnamurthy H, Sairam MR. Role of follitropin receptor signaling in nuclear protein transitions and chromatin condensation during spermatogenesis. *Biochemical and biophysical research communications*. 2003;312(3):697-701.

115. Saleh RA, Agarwal A, Sharma RK, Said TM, Sikka SC, Thomas AJ, Jr. Evaluation of nuclear DNA damage in spermatozoa from infertile men with varicocele. *Fertil Steril*. 2003;80(6):1431-6.

116. Potts RJ, Newbury CJ, Smith G, Notarianni LJ, Jefferies TM. Sperm chromatin damage associated with male smoking. *Mutation research*. 1999;423(1-2):103-11.

117. Kunzle R, Mueller MD, Hanggi W, Birkhauser MH, Drescher H, Bersinger NA. Semen quality of male smokers and nonsmokers in infertile couples. *Fertil Steril*. 2003;79(2):287-91.

118. Blumer CG, Fariello RM, Restelli AE, Spaine DM, Bertolla RP, Cedenho AP. Sperm nuclear DNA fragmentation and mitochondrial activity in men with varicocele. *Fertility and sterility*. 2008;90(5):1716-22.

119. Ahmadi A, Ng SC. Developmental capacity of damaged spermatozoa. *Human reproduction*. 1999;14(9):2279-85.

120. Carrell DT, Wilcox AL, Lowy L, Peterson CM, Jones KP, Erickson L, et al. Elevated sperm chromosome aneuploidy and apoptosis in patients with unexplained recurrent pregnancy loss. *Obstet Gynecol*. 2003;101(6):1229-35.

121. Nicopoullos JD, Gilling-Smith C, Almeida PA, Homa S, Norman-Taylor JQ, Ramsay JW. Sperm DNA fragmentation in subfertile men: the effect on the outcome of intracytoplasmic sperm injection and correlation with sperm variables. *BJU international*. 2008;101(12):1553-60.

122. Ribas-Maynou J, Garcia-Peiro A, Fernandez-Encinas A, Amengual MJ, Prada E, Cortes P, et al. Double stranded sperm DNA breaks, measured by Comet assay, are associated with unexplained recurrent miscarriage in couples without a female factor. *PloS one*. 2012;7(9):e44679.
123. Esbert M, Pacheco A, Vidal F, Florensa M, Riqueros M, Ballesteros A, et al. Impact of sperm DNA fragmentation on the outcome of IVF with own or donated oocytes. *Reproductive biomedicine online*. 2011;23(6):704-10.
124. Bungum M, Humaidan P, Spano M, Jepson K, Bungum L, Giwercman A. The predictive value of sperm chromatin structure assay (SCSA) parameters for the outcome of intrauterine insemination, IVF and ICSI. *Human reproduction*. 2004;19(6):1401-8.
125. Ribas-Maynou J, Garcia-Peiro A, Fernandez-Encinas A, Abad C, Amengual MJ, Prada E, et al. Comprehensive analysis of sperm DNA fragmentation by five different assays: TUNEL assay, SCSA, SCD test and alkaline and neutral Comet assay. *Andrology*. 2013;1(5):715-22.
126. Brinkworth MH. Paternal transmission of genetic damage: findings in animals and humans. *International journal of andrology*. 2000;23(3):123-35.
127. Barroso G, Morshedi M, Oehninger S. Analysis of DNA fragmentation, plasma membrane translocation of phosphatidylserine and oxidative stress in human spermatozoa. *Human reproduction (Oxford, England)*. 2000;15(6):1338-44.
128. Evenson DP, Darzynkiewicz Z, Melamed MR. Comparison of human and mouse sperm chromatin structure by flow cytometry. *Chromosoma*. 1980;78(2):225-38.
129. Fernandez JL, Muriel L, Goyanes V, Segrelles E, Gosalvez J, Enciso M, et al. Simple determination of human sperm DNA fragmentation with an improved sperm chromatin dispersion test. *Fertil Steril*. 2005;84(4):833-42.

130. Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental cell research*. 1988;175(1):184-91.
131. Erenpreiss J, Jepson K, Giwercman A, Tsarev I, Erenpreisa J, Spano M. Toluidine blue cytometry test for sperm DNA conformation: comparison with the flow cytometric sperm chromatin structure and TUNEL assays. *Human reproduction*. 2004;19(10):2277-82.
132. Chohan KR, Griffin JT, Lafromboise M, De Jonge CJ, Carrell DT. Comparison of chromatin assays for DNA fragmentation evaluation in human sperm. *Journal of andrology*. 2006;27(1):53-9.
133. Garcia-Peiro A, Oliver-Bonet M, Navarro J, Abad C, Guitart M, Amengual MJ, et al. Dynamics of sperm DNA fragmentation in patients carrying structurally rearranged chromosomes. *International journal of andrology*. 2011;34(6 Pt 2):e546-53.
134. Evenson DP. Sperm chromatin structure assay (SCSA(R)). *Methods in molecular biology*. 2013;927:147-64.
135. Fernandez JL, Muriel L, Goyanes V, Segrelles E, Gosalvez J, Enciso M, et al. Halosperm is an easy, available, and cost-effective alternative for determining sperm DNA fragmentation. *Fertil Steril*. 2005;84(4):860.
136. Harris PA, Taylor R, Thielke R, Payne J, Gonzalez N, Conde JG. Research electronic data capture (REDCap)--a metadata-driven methodology and workflow process for providing translational research informatics support. *J Biomed Inform*. 2009;42(2):377-81.
137. Rosen RC, Riley A, Wagner G, Osterloh IH, Kirkpatrick J, Mishra A. The international index of erectile function (IIEF): a multidimensional scale for assessment of erectile dysfunction. *Urology*. 1997;49(6):822-30.

138. Craig CL, Marshall AL, Sjostrom M, Bauman AE, Booth ML, Ainsworth BE, et al. International physical activity questionnaire: 12-country reliability and validity. *Med Sci Sports Exerc.* 2003;35(8):1381-95.
139. Prader A. Testicular size: assessment and clinical importance. *Triangle; the Sandoz journal of medical science.* 1966;7(6):240-3.
140. Dubin L, Amelar RD. Varicocele size and results of varicocelectomy in selected subfertile men with varicocele. *Fertility and sterility.* 1970;21(8):606-9.
141. Cooper TG, Noonan E, von Eckardstein S, Auger J, Baker HW, Behre HM, et al. World Health Organization reference values for human semen characteristics. *Human reproduction update.* 2010;16(3):231-45.
142. Kruger TF. *Atlas of Human Sperm Morphology Evaluation.* first ed. London: Taylor & Francis; 2004.
143. Kruger TF, Acosta AA, Simmons KF, Swanson RJ, Matta JF, Oehninger S. Predictive value of abnormal sperm morphology in in vitro fertilization. *Fertility and sterility.* 1988;49(1):112-7.
144. McKelvey-Martin VJ, Green MH, Schmezer P, Pool-Zobel BL, De Méo MP, Collins A. The single cell gel electrophoresis assay (comet assay): a European review. *Mutat Res.* 1993;288(1):47-63.
145. Dindo D, Demartines N, Clavien PA. Classification of surgical complications: a new proposal with evaluation in a cohort of 6336 patients and results of a survey. *Ann Surg.* 2004;240(2):205-13.
146. Garla P, Sala P, Torrinhas RSM, Machado NM, Fonseca DC, da Silva MM, et al. Reduced intestinal FADS1 gene expression and plasma omega-3 fatty acids following Roux-en-Y gastric bypass. *Clin Nutr.* 2018.

147. Santoro S, Castro LC, Velhote MC, Malzoni CE, Klajner S, Castro LP, et al. Sleeve gastrectomy with transit bipartition: a potent intervention for metabolic syndrome and obesity. *Ann Surg.* 2012;256(1):104-10.
148. Roth J, Qiang X, Marbán SL, Redelt H, Lowell BC. The obesity pandemic: where have we been and where are we going? *Obes Res.* 2004;12 Suppl 2:88S-101S.
149. Alberti KG, Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ, Cleeman JI, Donato KA, et al. Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity. *Circulation.* 2009;120(16):1640-5.
150. Esser N, Legrand-Poels S, Piette J, Scheen AJ, Paquot N. Inflammation as a link between obesity, metabolic syndrome and type 2 diabetes. *Diabetes Res Clin Pract.* 2014;105(2):141-50.
151. Monteiro R, Azevedo I. Chronic inflammation in obesity and the metabolic syndrome. *Mediators Inflamm.* 2010;2010.
152. Matsuzawa Y. The metabolic syndrome and adipocytokines. *FEBS Lett.* 2006;580(12):2917-21.
153. Schneider G, Kirschner MA, Berkowitz R, Ertel NH. Increased estrogen production in obese men. *J Clin Endocrinol Metab.* 1979;48(4):633-8.
154. Cohen PG. The hypogonadal-obesity cycle: role of aromatase in modulating the testosterone-estradiol shunt--a major factor in the genesis of morbid obesity. *Med Hypotheses.* 1999;52(1):49-51.
155. Eisenberg ML, Kim S, Chen Z, Sundaram R, Schisterman EF, Louis GM. The relationship between male BMI and waist circumference on semen quality: data from the LIFE study. *Hum Reprod.* 2015;30(2):493-4.

156. Zini A. Are sperm chromatin and DNA defects relevant in the clinic? *Syst Biol Reprod Med*. 2011;57(1-2):78-85.
157. Zini A, Boman JM, Belzile E, Ciampi A. Sperm DNA damage is associated with an increased risk of pregnancy loss after IVF and ICSI: systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod*. 2008;23(12):2663-8.
158. Bungum M, Humaidan P, Axmon A, Spano M, Bungum L, Erenpreiss J, et al. Sperm DNA integrity assessment in prediction of assisted reproduction technology outcome. *Hum Reprod*. 2007;22(1):174-9.
159. Zhang Z, Zhu L, Jiang H, Chen H, Chen Y, Dai Y. Sperm DNA fragmentation index and pregnancy outcome after IVF or ICSI: a meta-analysis. *J Assist Reprod Genet*. 2015;32(1):17-26.
160. Kasturi SS, Tannir J, Brannigan RE. The metabolic syndrome and male infertility. *J Androl*. 2008;29(3):251-9.
161. Tsatsanis C, Dermitzaki E, Avgoustinaki P, Malliaraki N, Mytaras V, Margioris AN. The impact of adipose tissue-derived factors on the hypothalamic-pituitary-gonadal (HPG) axis. *Hormones (Athens)*. 2015;14(4):549-62.
162. Kahn BE, Brannigan RE. Obesity and male infertility. *Curr Opin Urol*. 2017;27(5):441-5.
163. NIH conference. Gastrointestinal surgery for severe obesity. Consensus Development Conference Panel. *Ann Intern Med*. 1991;115(12):956-61.
164. Courcoulas AP, Yanovski SZ, Bonds D, Eggerman TL, Horlick M, Staten MA, et al. Long-term outcomes of bariatric surgery: a National Institutes of Health symposium. *JAMA Surg*. 2014;149(12):1323-9.
165. Salameh BS, Saleme B, Khoukaz MT, Bell RL. Metabolic and nutritional changes after bariatric surgery. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*. 2010;4(2):217-23.

166. Pham NH, Bena J, Bhatt DL, Kennedy L, Schauer PR, Kashyap SR. Increased Free Testosterone Levels in Men with Uncontrolled Type 2 Diabetes Five Years After Randomization to Bariatric Surgery. *Obes Surg*. 2018;28(1):277-80.
167. Legro RS, Kunselman AR, Meadows JW, Kesner JS, Krieg EF, Rogers AM, et al. Time-related increase in urinary testosterone levels and stable semen analysis parameters after bariatric surgery in men. *Reprod Biomed Online*. 2015;30(2):150-6.
168. Leichman JG, Wilson EB, Scarborough T, Aguilar D, Miller CC, Yu S, et al. Dramatic reversal of derangements in muscle metabolism and left ventricular function after bariatric surgery. *Am J Med*. 2008;121(11):966-73.
169. Rubino F, Schauer PR, Kaplan LM, Cummings DE. Metabolic surgery to treat type 2 diabetes: clinical outcomes and mechanisms of action. *Annu Rev Med*. 2010;61:393-411.
170. Amann RP. The cycle of the seminiferous epithelium in humans: a need to revisit? *J Androl*. 2008;29(5):469-87.
171. Sarwer DB, Lavery M, Spitzer JC. A review of the relationships between extreme obesity, quality of life, and sexual function. *Obes Surg*. 2012;22(4):668-76.
172. Schulster ML, Liang SE, Najari BB. Metabolic syndrome and sexual dysfunction. *Curr Opin Urol*. 2017;27(5):435-40.
173. Grimm RH, Grandits GA, Prineas RJ, McDonald RH, Lewis CE, Flack JM, et al. Long-term effects on sexual function of five antihypertensive drugs and nutritional hygienic treatment in hypertensive men and women. Treatment of Mild Hypertension Study (TOMHS). *Hypertension*. 1997;29(1 Pt 1):8-14.
174. Keddie AM. Associations between severe obesity and depression: results from the National Health and Nutrition Examination Survey, 2005-2006. *Prev Chronic Dis*. 2011;8(3):A57.

175. Camps MA, Zervos E, Goode S, Rosemurgy AS. Impact of Bariatric Surgery on Body Image Perception and Sexuality in Morbidly Obese Patients and their Partners. *Obes Surg*. 1996;6(4):356-60.
176. Aleid M, Muneer A, Renshaw S, George J, Jenkinson AD, Adamo M, et al. Early Effect of Bariatric Surgery on Urogenital Function in Morbidly Obese Men. *J Sex Med*. 2017;14(2):205-14.
177. Bonde JP, Giwercman A, Ernst E. Identifying environmental risk to male reproductive function by occupational sperm studies: logistics and design options. *Occup Environ Med*. 1996;53(8):511-9.
178. Gelijns AC, Ascheim DD, Parides MK, Kent KC, Moskowitz AJ. Randomized trials in surgery. *Surgery*. 2009;145(6):581-7.
179. Is BMI the best measure of obesity? *BMJ*. 2018;361:k2293.
180. Rodrigues J, Santin F, Barbosa Brito FS, Carrero JJ, Lindholm B, Cuppari L, et al. Sensitivity and Specificity of Body Mass Index as a Marker of Obesity in Elderly Patients on Hemodialysis. *J Ren Nutr*. 2016;26(2):65-71.
181. Garrido-Chamorro RP, Sirvent-Belando JE, Gonzalez-Lorenzo M, Martin-Carratala ML, Roche E. Correlation between body mass index and body composition in elite athletes. *J Sports Med Phys Fitness*. 2009;49(3):278-84.
182. Hendel HW, Gotfredsen A, Andersen T, Højgaard L, Hilsted J. Body composition during weight loss in obese patients estimated by dual energy X-ray absorptiometry and by total body potassium. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 1996;20(12):1111-9.
183. Coppini LZ, Waitzberg DL, Campos AC. Limitations and validation of bioelectrical impedance analysis in morbidly obese patients. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2005;8(3):329-32.

184. Bernhard AB, Scabim VM, Serafim MP, Gadducci AV, Santo MA, de Cleva R. Modified body adiposity index for body fat estimation in severe obesity. *J Hum Nutr Diet*. 2017;30(2):177-84.
185. Okorodudu DO, Jumean MF, Montori VM, Romero-Corral A, Somers VK, Erwin PJ, et al. Diagnostic performance of body mass index to identify obesity as defined by body adiposity: a systematic review and meta-analysis. *Int J Obes (Lond)*. 2010;34(5):791-9.
186. Wormser D, Kaptoge S, Di Angelantonio E, Wood AM, Pennells L, Thompson A, et al. Separate and combined associations of body-mass index and abdominal adiposity with cardiovascular disease: collaborative analysis of 58 prospective studies. *Lancet*. 2011;377(9771):1085-95.
187. Buchwald H, Avidor Y, Braunwald E, Jensen MD, Pories W, Fahrbach K, et al. Bariatric surgery: a systematic review and meta-analysis. *JAMA*. 2004;292(14):1724-37.
188. Santo MA, Riccioppo D, Pajecki D, Kawamoto F, de Cleva R, Antonangelo L, et al. Weight Regain After Gastric Bypass: Influence of Gut Hormones. *Obes Surg*. 2016;26(5):919-25.
189. Liu J, Zhang S, Liu M, Wang Q, Shen H, Zhang Y, et al. Prevalence of varicocoele and its association with body mass index among 39,559 rural men in eastern China: a population-based cross-sectional study. *Andrology*. 2017;5(3):562-7.
190. Gorur S, Candan Y, Helli A, Akcin S, Cekirge SD, Kaya YS, et al. Low body mass index might be a predisposing factor for varicocoele recurrence: a prospective study. *Andrologia*. 2015;47(4):448-54.