Inarí Marina Inti Ciccone

Novas perspectivas no papel da vitamina d e sua influência com a qualidade do sêmen e
hormônios sexuais em homens

Dissertação apresentada à Faculdade
de Medicina da Universidade de São
Paulo para obtenção do título de
Mestre em Ciências

Programa de Urologia

Orientador: Prof. Dr. Jorge Hallak

Versão corrigida e definitiva de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 13/10/2011.
A versão original esta disponível na Blioteca da FMUSP

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

Cicccone, Inarí Marina Inti

Novas perspectivas no papel da vitamina D e sua
influência com a qualidade do sêmen e hormônios
sexuais em homens / Inarí Marina Inti Cicccone. --
São Paulo, 2018.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.

Programa de Urologia.

Orientador: Jorge Hallak.

Descritores: 1.Infertilidade masculina
2.Deficiência de vitamina D 3.Análise do sêmen
4.Nutrição 5.Mobilidade espermática 6.Testosterona
7.Saúde do homem 8.Saúde reprodutiva

USP/FM/DBD-407/18

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

Conflito de interesse

Esse trabalho não apresenta nenhum conflito de interesse.

O desenvolvimento dessa pesquisa ocorreu na Clínica de Andrologia e Instituto do Homem Dr Jorge Hallak, em parceria com o laboratório de Referência em Andrologia, Criopreservação e Reprodução Humana Androscience no período entre 2015 a 2018.

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho à minha família, por sempre me apoiarem e me incentivarem a ser melhor, e ir sempre além. Dedico especialmente aos meus pais, e ao meu irmão Iago, que já não está entre nós, mas me ensinou como levar a vida com garra e força, uma vez que não temos nada a perder, só a ganhar.

“A verdadeira viagem de descobrimento não consiste em procurar novas paisagens, mas em ter novos olhos”. (Marcel Proust)

AGRADECIMENTO

Agradeço principalmente aos meus pais pelo esforço imenso de me formar em uma profissional excelente.

Aos meus Professores da graduação que me deram uma ótima formação e senso crítico.

Aos amigos e familiares que estiveram presente nos momentos de alegria e deram o apoio tão necessário nos momentos de dificuldade.

A toda equipe da clínica e laboratório Androscience que sempre me ajudaram e permitiram que esse estudo pudesse ser realizado, especialmente aos colegas Juliana Pariz, João Brunhara e Thiago Teixeira por toda ajuda no trabalho.

Ao meu orientador Prof. Dr Jorge Hallak e a co-orientadora Prof.^a Dra Elaine Frade Costa por toda ajuda, orientação e ensinamentos, além de facilitarem para que isso seja possível.

Agradeço especialmente a Dra Karina Barros, pelo exemplo, inspiração e todos ensinamentos que me proporcionou na carreira da Nutrição e como uma futura pesquisadora.

A todos os demais colaboradores que auxiliaram nesse trabalho, inclusive a Elisa e o coordenador Alberto da pós-graduação da Urologia.

Agradeço a Capes, Androscience e a pós-graduação da Urologia pelo auxílio financeiro.

SUMÁRIO

Abreviaturas e Siglas.....	VI
Lista de Figuras e Tabelas.....	VIII
Resumo.....	X
Abstract.....	XI
1.0 - Introdução.....	1
1.1 – A epidemia da deficiência de Vitamina D.....	1
1.2 – O metabolismo da vitamina D.....	3
1.3 – A relação da Vitamina D e o sistema reprodutivo.....	5
1.4 - A Vitamina D e a sua relação com a qualidade seminal.....	6
1.5- A Vitamina D e sua relação com os hormônios sexuais.....	7
2.1 – Objetivo geral e específicos.....	9
3.0 – Metodologia.....	10
3.1 – Desenho do estudo.....	10
3.2 – Amostra Populacional.....	10
3.3. Análises seminais e laboratoriais.....	12
3.4 – Análise Estatística.....	14
4.0 – Resultados.....	16
4.1 – Característica da amostra.....	16
4.2 – Vitamina D e parâmetros seminais.....	18
4.3 – Vitamina D e hormônios sexuais.....	24
5.0 – Discussão.....	28
6.0 – Conclusão.....	32
7.0 – Referências Bibliográficas.....	33
Anexo 1 – Carta de dispensa do TCLE.....	40
Anexo 2 – Tabelas.....	41
Anexo 3 – Prêmio recebido no ASA 42nd Annual Conference.....	43
Anexo 4 – Prêmio recebido no ASA 43nd Annual Conference.....	44

ABREVIATURAS E SIGLAS

CYP27B1 - Cytochrome P450 Family 27 Subfamily B

CYP2R1 - Cytochrome P450 Family 2 Subfamily R Member 1

CYP24A1 - Cytochrome P450 24A1

DBP - Vitamin D Binding Protein

DRI - Dietary Reference Intake

IVF – Fertilização *in vitro*

NCX1 - Na⁺-Ca²⁺ exchanger 1 Read

OMS – Organização Mundial da Saúde

PMCA1 - Plasma Membrane Calcium ATPase Isoform 1

PTH – Paratormônio

RXR - Receptor X Retinoide

SHBG - Sex Hormone-Binding Globulin

TRPV5 - Transient Receptor Potential Vanilloid Member 5

TRPV6 - Transient Receptor Potential Cation Channel Subfamily V Member 6

UVB – Radiação Ultravioleta B

VDR - Vitamin D receptor

VDRE - Vitamin D Response Element

VD – Vitamina D

WHO – World Health Organization

1 α ,25(OH)₂VD - 1 α ,25-diidroxi-vitamina D

7-DHC – 7-Deidrocolesterol

25(OH) D - 25-hidroxivitamina D

DRI - Dietary Reference Intake

DNA - ácido desoxirribonucléico (português) e do inglês deoxyribonucleic acid

VD₂ – Ergocalciferol

VD₃ – Colecalciferol

ASRM – do inglês *American Society for Reproductive Medicine*

SHBG - do inglês: sex hormone-binding globulin

LH – do inglês: luteinizing hormone

FSH – do inglês: Follicle-stimulating hormone

NZG – Grupo com homens normozoospermicos

SAG – Grupo com homens com alterações seminais

IMC – Índice de massa corporal

HOMA-IR - do inglês: homeostatic model assessment

DP – Desvio Padrão

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

· **Figuras:**

Figura 1: Metabolismo sistêmico da Vitamina D com ação no trato reprodutor masculino.....	4
Figura 2: Diagrama de obtenção da amostra.....	11
Figura 3: Box-plot dos concentrações séricas de 25(OH)D nos pacientes com alterações seminais (SAG) vs pacientes com normozoospermia NZG).....	18
Figura 4: Diagrama de dispersão do parâmetro seminal de número total de espermatozoides progressivos e níveis séricos de 25(OH)D.....	19
Figura 5: Diagrama de dispersão do parâmetro seminal número total de espermatozoides móveis e níveis séricos de 25(OH)D.....	20
Figura 6: Diagrama de dispersão do parâmetro seminal motilidade total progressiva e níveis séricos de 25(OH)D.....	20
Figura 7: Diagrama de dispersão do parâmetro seminal número total de espermatozoides e níveis séricos de 25(OH)D.....	21
Figura 8: Diagrama de dispersão do parâmetro seminal Motilidade Total e os níveis séricos de 25(OH)D....	21
Figura 9: Diagrama de dispersão do parâmetro seminal Motilidade total Progressiva e níveis séricos de 25(OH)D.....	22
Figura 10: Diagrama de dispersão do parâmetro seminal Morfologia, por OMS 2010 e os níveis séricos de 25(OH)D.....	22
Figura 11: Diagrama de dispersão do parâmetro seminal Morfologia, por Kruger e os níveis séricos de 25(OH)D.....	23
Figura 12: Diagrama de dispersão dos níveis séricos de Testosterona Total e 25(OH)D.....	24

· **Tabelas:**

Tabela 1: Resumo descritivo da amostra e comparação entre os grupos.....17

Tabela 2: Contribuição de cada variável analisada nos parâmetros seminais, coeficiente β e valor de p obtidos a partir dos modelos de Regressão Linear Multivariada.....26

Tabela 3: Contribuição de cada variável analisada nos parâmetros hormonais, coeficiente β e valor de p obtidos a partir dos modelos de Regressão Linear Multivariada.....27

Resumo

Ciccone IMI. *Novas perspectivas no papel da vitamina d e sua influência com a qualidade do sêmen e hormônios sexuais em homens* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2018.

A vitamina D é uma molécula versátil que possui ação genômica e não genômica em múltiplas reações dos seus órgãos que possuem a expressão de seu receptor (VDR), inclusive do trato reprodutivo de ambos os sexos, além dos seus clássicos efeitos no metabolismo ósseo, e na homeostase do cálcio e fósforo. Novas evidências a partir de estudos experimentais e com humanos sugerem que a vitamina D está envolvida nas funções dos órgãos reprodutivos masculinos, influenciando na espermatogênese. O objetivo do presente estudo foi avaliar a influência dos níveis séricos de 25(OH)D com os parâmetros de qualidade seminal em homens normozoospermicos e com alterações nos parâmetros seminais. Nesse estudo retrospectivo, dos 508 pacientes atendidos no período de 2009 até 2017 com todas as dosagens séricas e análise seminal, selecionamos os dados de 260 pacientes que atenderam aos critérios de inclusão, de uma clínica médica de Andrologia da cidade de São Paulo. Eles foram divididos em dois grupos: Grupo normozoospermicos (NZG; N=124) e Grupo com parâmetros Seminais Alterados (SAG; N=136). Foram considerados as dosagens séricas de 25(OH)D, e as variáveis de confusão ambientais, como uso de álcool, tabaco, sedentarismo, índice de massa corporal (IMC), e presença de varicocele. As análises seminais foram realizadas e classificadas de acordo com o manual da OMS 2010, e foram consideradas para o estudo os parâmetros de pH, volume, motilidade total e progressiva, morfologia por OMS e Kruger. Além disso, foram consideradas os exames de Cariótipo e Micro deleção no Cromossomo Y. As análises estatísticas foram realizadas com o SPSS versão 19.0. Correlação de Spearman, Mann-Whitney e um modelo de regressão multivariada foram aplicadas. Significância considerada foi de $P \leq 0.05$. A distribuição das médias dos níveis séricos de 25(OH)D foi significativamente menor nos pacientes do grupo com parâmetros seminais alterados ($P = 0.016$), e foi encontrado uma correlação positiva entre os níveis séricos de 25(OH)D e todos os parâmetros de qualidade seminal analisados, exceto de pH e volume. Foi descrita correlação forte entre 25(OH)D e motilidade total ($r = 0,225$; $P = 0,001$). Os resultados obtidos nesse estudo mostram que os níveis séricos de 25(OH)D possuem uma correlação positiva com os parâmetros de motilidade, concentração e morfologia do espermatozoide, de forma independente. Esses achados indicam que a adequação dos níveis de vitamina D podem ser um importante coadjuvante no tratamento da infertilidade masculina.

Descritores: infertilidade masculina; deficiência de vitamina D; análise do sêmen; nutrição; mobilidade espermática; testosterona; saúde do homem; saúde reprodutiva.

Abstract

Ciccone IMI. *New perspectives into the positive role of vitamin “d” in determining better sperm quality and higher testosterone levels in men.* São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2018.

Vitamin D is a versatile signaling molecule, that targets also male reproductive organs, in addition to the classic effects on bone, calcium and phosphate homeostasis. Accumulating evidence from animal and human studies suggests that it is involved in reproduction functions in both genders. This study aimed to evaluate the vitamin D correlation with semen quality in male with seminal parameters alteration and normozoospermic diagnosis.

We selected 260 men (aged 18 to 60 y.o.) from a private andrology reference medical clinic for this observatory study. They were divided in two groups: Normal seminal parameters (NZG N=124) and Abnormal seminal parameters (SAG N=136). 25(OH) vitamin D serum concentration were collected such as lifestyle data available. Semen was analyzed according to WHO 2010 guidelines, pH, volume, motility, concentration, morphology, strict criteria and sperm functional tests were performed (ROS, CK, beads). In addition, karyotype, frequency of varicocele, smoking, alcohol ingestion, and body composition were considered. Statistical analysis was performed by SPSS program version 19.0 (SPSS Inc., Chicago, IL). Spearman correlation, Mann-Whitney test and regression model were applied. Statistical significance was considered with P value < 0.05. The 25(OH)D average distribution concentration were significant lower in Abnormal seminal parameters group ($P=0.016$), and all parameters had a positive correlation with 25(OH)D serum levels. The highest coefficient value was observed in the association of total motility with Vitamin D ($P=0.001$). Our results demonstrated that 25(OH)D levels has a positive influence on spermatogenesis and semen quality, suggesting that vitamin D replacement should highly be concerned on male fertility treatment.

Descriptors: infertility, male; vitamin D deficiency; semen analysis; nutrition; sperm motility; testosterone; men's health; reproductive health.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Ciccione, Inarí Marina Inti

Novas perspectivas no papel da vitamina D e sua influência com a qualidade do sêmen e hormônios sexuais em homens / Inarí Marina Inti Ciccione. -- São Paulo, 2018.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Programa de Urologia.

Orientador: Jorge Hallak.

Descritores: 1.Infertilidade masculina
2.Deficiência de vitamina D 3.Análise do sêmen
4.Nutrição 5.Mobilidade espermática 6.Testosterona
7.Saúde do homem 8.Saúde reprodutiva

USP/FM/DBD-407/18

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

Conflito de interesse

Esse trabalho não apresenta nenhum conflito de interesse.

O desenvolvimento dessa pesquisa ocorreu na Clínica de Andrologia e Instituto do Homem Dr Jorge Hallak, em parceria com o laboratório de Referência em Andrologia, Criopreservação e Reprodução Humana Androscience no período entre 2015 a 2018.

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho à minha família, por sempre me apoiarem e me incentivarem a ser melhor, e ir sempre além. Dedico especialmente aos meus pais, e ao meu irmão Iago, que já não está entre nós, mas me ensinou como levar a vida com garra e força, uma vez que não temos nada a perder, só a ganhar.

“A verdadeira viagem de descobrimento não consiste em procurar novas paisagens, mas em ter novos olhos”. (Marcel Proust)

AGRADECIMENTO

Agradeço principalmente aos meus pais pelo esforço imenso de me formar em uma profissional excelente.

Aos meus Professores da graduação que me deram uma ótima formação e senso crítico.

Aos amigos e familiares que estiveram presente nos momentos de alegria e deram o apoio tão necessário nos momentos de dificuldade.

A toda equipe da clínica e laboratório Androscience que sempre me ajudaram e permitiram que esse estudo pudesse ser realizado, especialmente aos colegas Juliana Pariz, João Brunhara e Thiago Teixeira por toda ajuda no trabalho.

Ao meu orientador Prof. Dr Jorge Hallak e a co-orientadora Prof.^a Dra Elaine Frade Costa por toda ajuda, orientação e ensinamentos, além de facilitarem para que isso seja possível.

Agradeço especialmente a Dra Karina Barros, pelo exemplo, inspiração e todos ensinamentos que me proporcionou na carreira da Nutrição e como uma futura pesquisadora.

A todos os demais colaboradores que auxiliaram nesse trabalho, inclusive a Elisa e o coordenador Alberto da pós-graduação da Urologia.

Agradeço a Capes, Androscience e a pós-graduação da Urologia pelo auxílio financeiro.

SUMÁRIO

Abreviaturas e Siglas.....	VI
Lista de Figuras e Tabelas.....	VIII
Resumo.....	X
Abstract.....	XI
1.0 - Introdução.....	1
1.1 – A epidemia da deficiência de Vitamina D.....	1
1.2 – O metabolismo da vitamina D.....	3
1.3 – A relação da Vitamina D e o sistema reprodutivo.....	5
1.4 - A Vitamina D e a sua relação com a qualidade seminal.....	6
1.5- A Vitamina D e sua relação com os hormônios sexuais.....	7
2.1 – Objetivo geral e específicos.....	9
3.0 – Metodologia.....	10
3.1 – Desenho do estudo.....	10
3.2 – Amostra Populacional.....	8
3.3. Análises seminais e laboratoriais.....	12
3.4 – Análise Estatística.....	14
4.0 – Resultados.....	16
4.1 – Característica da amostra.....	16
4.2 – Vitamina D e parâmetros seminais.....	19
4.3 – Vitamina D e hormônios sexuais.....	24
5.0 – Discussão.....	30
6.0 – Conclusão.....	34
7.0 – Referências Bibliográficas.....	35
Anexo 1 – Carta de dispensa do TCLE.....	41
Anexo 2 – Tabelas.....	42
Anexo 3 – Prêmio recebido no ASA 42nd Annual Conference.....	44

ABREVIATURAS E SIGLAS

CYP27B1 - Cytochrome P450 Family 27 Subfamily B

CYP2R1 - Cytochrome P450 Family 2 Subfamily R Member 1

CYP24A1 - Cytochrome P450 24A1

DBP - Vitamin D Binding Protein

DRI - Dietary Reference Intake

IVF – Fertilização *in vitro*

NCX1 - Na⁺-Ca²⁺ exchanger 1 Read

OMS – Organização Mundial da Saúde

PMCA1 - Plasma Membrane Calcium ATPase Isoform 1

PTH – Paratormônio

RXR - Receptor X Retinoide

SHBG - Sex Hormone-Binding Globulin

TRPV5 - Transient Receptor Potential Vanilloid Member 5

TRPV6 - Transient Receptor Potential Cation Channel Subfamily V Member 6

UVB – Radiação Ultravioleta B

VDR - Vitamin D receptor

VDRE - Vitamin D Response Element

VD – Vitamina D

WHO – World Health Organization

1 α ,25(OH)₂VD - 1 α ,25-diidroxi-vitamina D

7-DHC – 7-Deidrocolesterol

25(OH) D - 25-hidroxivitamina D

DRI - Dietary Reference Intake

DNA - ácido desoxirribonucléico (português) e do inglês deoxyribonucleic acid

VD₂ – Ergocalciferol

VD₃ – Colecalciferol

ASRM – do inglês *American Society for Reproductive Medicine*

SHBG - do inglês: sex hormone-binding globulin

LH – do inglês: luteinizing hormone

FSH – do inglês: Follicle-stimulating hormone

NZG – Grupo com homens normozoospermicos

SAG – Grupo com homens com alterações seminais

IMC – Índice de massa corporal

HOMA-IR - do inglês: homeostatic model assessment

DP – Desvio Padrão

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

· **Figuras:**

Figura 1: Metabolismo sistêmico da Vitamina D com ação no trato reprodutor masculino.....	4
Figura 2: Diagrama de obtenção da amostra.....	11
Figura 3: Box-plot dos concentrações séricas de 25(OH)D nos pacientes com alterações seminais (SAG) vs pacientes com normozoospermia NZG).....	18
Figura 4: Diagrama de dispersão do parâmetro seminal de número total de espermatozoides progressivos e níveis séricos de 25(OH)D.....	19
Figura 5: Diagrama de dispersão do parâmetro seminal número total de espermatozoides móveis e níveis séricos de 25(OH)D.....	20
Figura 6: Diagrama de dispersão do parâmetro seminal motilidade total progressiva e níveis séricos de 25(OH)D.....	20
Figura 7: Diagrama de dispersão do parâmetro seminal número total de espermatozoides e níveis séricos de 25(OH)D.....	21
Figura 8: Diagrama de dispersão do parâmetro seminal Motilidade Total e os níveis séricos de 25(OH)D....	21
Figura 9: Diagrama de dispersão do parâmetro seminal Motilidade total Progressiva e níveis séricos de 25(OH)D.....	22
Figura 10: Diagrama de dispersão do parâmetro seminal Morfologia, por OMS 2010 e os níveis séricos de 25(OH)D.....	22
Figura 11: Diagrama de dispersão do parâmetro seminal Morfologia, por Kruger e os níveis séricos de 25(OH)D.....	23
Figura 12: Diagrama de dispersão dos níveis séricos de Testosterona Total e 25(OH)D.....	24

· **Tabelas:**

Tabela 1: Resumo descritivo da amostra e comparação entre os grupos.....	17
Tabela 2: Coeficientes de correlação de Spearman (r) dos parâmetros seminais e das variáveis explicativas, tamanhos da amostra (N) e valores de p obtidos nos testes de significância dos coeficientes.....	26
Tabela 3: Coeficientes de correlação de Spearman (r) das variáveis de confusão com os hormônios sexuais, tamanhos da amostra (N) e valores de p obtidos nos testes de significância dos coeficientes	26
Tabela 4: Contribuição de cada variável analisada nos parâmetros seminais, coeficiente β e valor de p obtidos a partir dos modelos de Regressão Linear Multivariada.....	28
Tabela 5: Contribuição de cada variável analisada nos parâmetros hormonais, coeficiente β e valor de p obtidos a partir dos modelos de Regressão Linear Multivariada.....	29

Resumo

Ciccone IMI. *Novas perspectivas no papel da vitamina d e sua influência com a qualidade do sêmen e hormônios sexuais em homens* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2018.

A vitamina D é uma molécula versátil que possui ação genômica e não genômica em múltiplas reações dos seus órgãos que possuem a expressão de seu receptor (VDR), inclusive do trato reprodutivo de ambos os sexos, além dos seus clássicos efeitos no metabolismo ósseo, e na homeostase do cálcio e fosfato. Novas evidências a partir de estudos experimentais e com humanos sugerem que as moléculas da família da vitamina D estão envolvidas nas funções dos órgãos reprodutivos masculinos, influenciando na espermatogênese. O objetivo do presente estudo foi avaliar a influência dos níveis séricos de 25(OH)D com os parâmetros de qualidade seminal em homens normozoospermicos e com alterações nos parâmetros seminais. Nesse estudo retrospectivo, dos 501 pacientes atendidos no período de 2009 até 2017 com todas as dosagens séricas e análise seminal, selecionamos os dados de 260 pacientes que atenderam aos critérios de inclusão, de uma clínica médica de Andrologia da cidade de São Paulo. Eles foram divididos em dois grupos: Parâmetros Seminais Normais (PSN; N=124) e Parâmetros Seminais Alterados (PSA; N=136). Foram considerados as dosagens séricas de 25(OH)D, e as variáveis de confusão ambientais, como uso de álcool, tabaco, sedentarismo, índice de massa corporal (IMC), e presença de varicocele. As análises seminais foram realizadas e classificadas de acordo com o manual da OMS 2010, e foram consideradas para o estudo os parâmetros de pH, volume, motilidade total e progressiva, morfologia por OMS e Kruger. Além disso, foram consideradas os exames de Cariótipo e Micro deleção no Cromossomo Y. As análises estatísticas foram realizadas com o SPSS versão 19.0. Correlação de Spearman, Mann-Whitney e um modelo de regressão multivariada foram aplicadas. Significância considerada foi de $p \geq 0.05$. A distribuição das médias dos níveis séricos de 25(OH)D foi significativamente menor nos pacientes do grupo com parâmetros seminais alterados ($p=0.016$), e foi encontrado uma correlação positiva entre os níveis séricos de 25(OH)D e todos os parâmetros de qualidade seminal analisados, exceto de pH e volume. A correlação mais forte encontrada foi com a motilidade total ($r=0,225$; $p=0,001$), mesmo considerando as variáveis de confusão. Os resultados obtidos nesse estudo mostram que os níveis séricos de 25(OH)D possuem uma correlação positiva com os parâmetros de motilidade, concentração e morfologia do espermatozoide. Esses achados indicam que a adequação dos níveis de vitamina D podem ser um importante coadjuvante no tratamento da infertilidade masculina. Vale constar que a deficiência de vitamina D atingiu proporções epidêmicas mesmo em países tropicais como o Brasil.

Descritores: infertilidade masculina; deficiência de vitamina D; análise do sêmen; nutrição; mobilidade espermática; testosterona; saúde do homem; saúde reprodutiva.

Abstract

Ciccone IMI. *New perspectives into the positive role of vitamin “d” in determining better sperm quality and higher testosterone levels in men.* São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2018.

Vitamin D is a versatile signaling molecule, that targets also male reproductive organs, in addition to the classic effects on bone, calcium and phosphate homeostasis. Accumulating evidence from animal and human studies suggests that it is involved in reproduction functions in both genders. This study aimed to evaluate the vitamin D correlation with semen quality in male with seminal parameters alteration and normozoospermic diagnosis.

We selected 260 men (aged 18 to 60 y.o.) from a private andrology reference medical clinic for this observatory study. They were divided in two groups: Normal seminal parameters (n=124) and Abnormal seminal parameters (n=136). 25(OH) vitamin D serum concentration were collected such as lifestyle data available. Semen was analyzed according to WHO 2010 guidelines, pH, volume, motility, concentration, morphology, strict criteria and sperm functional tests were performed (ROS, CK, beads). In addition, karyotype, frequency of varicocele, smoking, alcohol ingestion, and body composition were considered. Statistical analysis was performed by SPSS program version 19.0 (SPSS Inc., Chicago, IL). Spearman correlation, Mann-Whitney test and regression model were applied. Statistical significance was considered with P value < 0.05. The 25(OH)D average distribution concentration were significant lower in Abnormal seminal parameters group (p=0.016), and all parameters had a positive correlation with 25(OH)D serum levels. The highest coefficient value was observed in the association of total motility with Vitamin D (p=0.001). Our results demonstrated that 25(OH)D levels has a positive influence on spermatogenesis and semen quality, suggesting that vitamin D replacement should highly be concerned on male fertility treatment and that low vitamin D have reached epidemic proportions in industrialized cities, even in Brazil.

Descriptors: infertility, male; vitamin D deficiency; semen analysis; nutrition; sperm motility; testosterone; men's health; reproductive health.

01 – INTRODUÇÃO

1.1 – A *epidemia da deficiência de Vitamina D*

O termo vitamina D (VD) se refere a um grupo de vitaminas lipossolúveis e sua família é composta por moléculas derivadas do 7-deidrocolesterol (7-DHC) interligadas através de uma cascata de reações fotolíticas e enzimáticas que acontecem de forma sistêmica (Boillon *et al.* 1995). Sob essa denominação ampla, abrangem-se tanto o metabólito ativo 1 α ,25-diidroxi-vitamina D [1,25(OH) $_2$ D] ou calcitriol, assim como seus precursores, tais como a vitamina D3 ou colecalciferol, vitamina D2 ou ergosterol e a 25-hidroxivitamina D [25(OH) D] ou calcidiol. Sendo assim, ela é considerada atualmente como um hormônio com ação atuante no sistema endócrino, o qual é formado pelos metabólitos que compõem o grupo vitamina D, como a sua proteína carreadora (DBP, *vitamin D binding protein*), seu receptor (VDR, *vitamin D receptor*) e pelas diversas enzimas que participam da cascata de reações de ativação e inativação da sua metabolização (Norman, 2008).

A principal função orgânica a VD é a manutenção dos níveis plasmáticos adequados de cálcio e fósforo, mantendo as funções metabólicas, a mineralização óssea e a transmissão neuromuscular (Anderson *et al.* 2012; Intitute of Medicine, 2011). O reconhecimento da importância da VD na homeostase sistêmica despertou um grande interesse na comunidade científica, demonstrado pelo expressivo número de trabalhos publicados recentemente. Uma série de estudos epidemiológicos mostraram que uma significativa parcela da população mundial, independentemente da idade, etnia e da localização geográfica, apresentam baixos níveis de VD (Hagenau *et al.*, 2009; Van Schoor e Lips, 2011). A deficiência de VD é atualmente considerado um importante problema de saúde pública, tanto em países desenvolvidos e subdesenvolvidos, inclusive em países tropicais, como o Brasil, sendo que a prevalência nesses países varia entre 30 a 90% (Hosseinpanah *et al.*, 2010; Holick *et al.*, 2011; Institute of Medicine, 2011).

Em território brasileiro, estudos mostram prevalência de níveis insuficientes e deficientes de 25(OH)D em cerca de 60% dos adolescentes (Peters *et al.*, 2012); de 40% e 58% entre adultos jovens (Premaor *et al.*, 2008; Maeda, 2010), e entre 42% e 83% em idosos, com taxas mais altas nos indivíduos com idades mais avançadas (Holick, 2007; Silva *et al.*, 2008). Lopes *et al.* (2017) encontraram uma prevalência de 81,1% de níveis

insuficientes e deficientes de vitamina D em mulheres com queixa de infertilidade atendidas em um centro de reprodução assistida em Brasília (Lopes *et al.*, 2017), eles concluíram que a prevalência de deficiência de VD em mulheres em idade reprodutiva é elevada, independentemente do seu potencial fértil. Porém eles reforçam que o mecanismo de influência desse composto no sistema reprodutor feminino deve ser estudado de forma mais aprofundada (Lopes *et al.*, 2017).

Os níveis séricos de VD são determinados a partir de fatores como a quantidade de exposição a luz solar, estação do ano, tipo de vestuário, latitude geográfica, ingestão diária de VD, obesidade e poluição do ar (Webb *et al.*, 1988; Hosseinpanah *et al.*, 2010; Lefevre, 2015; Overton *et al.*, 2015). Além disso, a quantidade de melanina na pele do indivíduo e o comprimento de onda da radiação solar também podem influenciar. Esse pigmento compete pelo fóton da radiação UVB nos comprimentos de onda entre 290 e 315nm, diminuindo a disponibilidade de fótons para a fotólise do 7-DHC (Hagenau *et al.*, 2009). Estudos mostram menores reservas da 25(OH)D em indivíduos negros quando comparados aos caucasianos (Webb *et al.*, 1988), entretanto as duas etnias têm a mesma capacidade de síntese de 25(OH)D (Looker *et al.*, 2002), porém indivíduos com pele mais escura precisam de mais tempo de exposição ao sol para sintetizarem a vitamina D3 (Brazier *et al.*, 1988).

Devido à baixa disponibilidade e variedade de VD em alimentos, uma pequena parcela da ingestão diária recomendada (DRI, *Dietary Reference Intake*) de vitamina D pode ser suprida a partir da dieta (Holick *et al.*, 2011). As principais fontes dietéticas são na forma de colesterciferol (vitamina D₃), presente nos peixes gordurosos de água fria e profunda, como atum e salmão, e no óleo de peixe e de fígado de bacalhau, além da forma de ergosterol (vitamina D₂), de origem vegetal, presente nos fungos comestíveis que são produzidos com exposição a luz solar. Outra forma de sintetizar o colesterciferol é de forma endógena, através da produção na pele ativada pelos raios UVB (Holick, 2008; Medicine, 2011).

Os níveis séricos de VD são comumente mensurados a partir da dosagem da concentração do 25(OH)D, devido ao seu maior tempo médio de circulação e vida útil. A manutenção dos níveis séricos suficientes, acima de 30ng/ml, de acordo com as Diretrizes da Sociedade Americana de Endocrinologia (Holick *et al.* 2011), é essencial para a saúde dos tecidos músculos-esqueléticos (Holick *et al.* 2011, Holick 2007). A hipovitaminose D (abaixo de 20ng/ml) é associada com uma má mineralização óssea, resultando de patologias como raquitismo, osteopenia e osteomalácia, com o aumento do metabolismo

ósseo e elevado risco de quedas e fraturas (Webb *et al.*, 1988; Holick, 2007; Premaor *et al.*, 2008). Além disso, a deficiência de VD está associada a eventos extra esqueléticos, tais como hipertensão, eventos cardiovasculares, derrame, diabetes, câncer, depressão, obesidade, doenças autoimunes (Jensen, 2014).

1.2 - O metabolismo da Vitamina D

O colecalfiferol, precursor da forma ativa de VD, é produzido na pele a partir da conversão da 7-deidrocolesterol pela radiação ultravioleta, especificamente a radiação ultravioleta B (UVB) nos comprimentos de onda entre 290 e 315 nanômetros (Jensen, 2014). Na corrente sanguínea este ativo é metabolizado, recebendo duas hidroxilas para formar a molécula ativa da Vitamina D, a $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. O primeiro passo ocorre no fígado, a partir da atividade da enzima hepática 25-hidroxilase, e então no rim, a partir da atividade da 1α -hidroxilase. Posteriormente, a $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ se liga ao VDR, ativando os mecanismos para ocorrer a heterodimerização com o receptor X retinoide (RXR). Esse complexo hormônio-receptor é heterodimerizado com o RXR e o heterodímero $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -VDR-RXR, produto final dessa reação, acopla-se a uma sequência específica do DNA nos seus genes-alvos, que é denominada VDRE (*vitamin D response element*). Esse processo ocorre na transcrição gênica, mediada pelo VDR. No entanto, além da sua atividade genômica, a expressão do VDR e a forma ativa $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ também estão relacionados a reações não genômicas (Prosser e Jones, 2004; Blomberg Jensen *et al.*, 2010; Jensen, 2014). A Figura 1 ilustra as etapas de metabolização da VD e sua ação no trato reprodutivo.

Figura 1: Metabolismo sistêmico da Vitamina D com ação no trato reprodutor masculino

Fonte: Ilustração desenvolvida pela equipe Androscience

Legenda: Após a exposição solar, o primeiro passo para a síntese de vitamina D acontece com a conversão do 7-deidrocolesterol em colecalciferol pelos raios UVB na pele, do mesmo modo, esse composto pode ser absorvido pelo intestino através da ingestão de alimentos ou suplementos com fontes de VD₂ e VD₃. Essa molécula é biologicamente inativa, para ser transportada ela é carregada pela Proteína Carreadora da Vitamina D (DBP) e então ela recebe duas hidroxilas para se ativar e formar a 1α,25-dihidroxitaminaD₃, a forma ativa. A primeira etapa ocorre no fígado através da ação da enzima 25-hidroxilase, codificada pelo gene CYP2R1, em seguida no rim pela ação da enzima 1α-hidroxilase, que é codificada pelo gene CYP27B1, resultando a 1,25(OH)₂D₃. Esse composto se liga ao Receptor de Vitamina D (VDR), localizado nas células e tecidos alvos, desencadeando uma resposta em cascata e mediando reações genômicas e não genômicas na célula alvo. Todas as formas circulantes da VD podem ser inativadas pela enzima 24-hidroxilase, que é codificada pelo gene CYP24A1 resultando na forma inativa da Vitamina D, a 24,25(OH)₂D₃. O testículo e as células do trato reprodutor, principalmente as células de Leydig, Sertoli, espermatogonias e o espermatozoide, possuem uma elevada expressão do VDR e das enzimas que a metabolizam. Quando a forma ativa se liga ao receptor, são desencadeadas ações genômicas e não genômicas nas células alvos.

Os estudos bioquímico-moleculares sobre o metabolismo dos componentes do sistema endocrinológico da VD têm provido fortes evidências da magnitude e da ampla abrangência desse sistema na modulação de processos celulares essenciais à homeostase sistêmica, principalmente nas concentrações de cálcio (Castro 2011). Os aspectos ainda não são totalmente compreendidos e alguns controversos sobre a sinalização do complexo 1,25(OH)₂D-VDR nos vários tecidos que decorrem, mas também de sua contínua interação com outros eixos metabólicos e da determinação genética, a qual condiciona a expressão e a integração dos vários componentes desse sistema (Blomberg Jensen e Dissing, 2012). Por ser um sistema complexo e que interfere na regulação de cerca de 3% do genoma humano de forma direta ou indiretamente, é possível que a demanda da 1,25(OH)₂D seja diferente nos diversos tecidos, ou seja, cada tecido e célula alvo possui uma capacidade de regulação dos níveis de VD, inclusive o testículo (Castro, 2011).

1.3 - A relação da Vitamina D e o sistema reprodutivo

A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que aproximadamente 80 milhões de pessoas ao redor do mundo apresentem problemas relacionados à fertilidade (Vela *et al.*, 2009). De acordo com a Sociedade Americana de Medicina Reprodutiva (*American Society for Reproductive Medicine – ASRM*), a infertilidade é considerada uma disfunção do sistema reprodutor, que é constatada após um período de doze meses de tentativa de concepção de gravidez sem sucesso, onde o casal manteve relações sexuais sem a utilização de métodos contraceptivos. Atualmente a infertilidade é um sério problema de saúde que afeta a vida de pelo menos 15% da população dos países desenvolvidos (Boivin *et al.*, 2007).

Crescentes evidências, a partir de estudos realizados com animais e humanos, sugerem que a VD está envolvida em mecanismos influenciando o sistema reprodutor de ambos os sexos (Lerchbaum e Obermayer-Pietsch, 2012). Isso vem sendo enfatizado com os estudos que observam a correlação positiva dos níveis dessa vitamina, em mulheres, com o sucesso do tratamento com fertilização *in vitro*, com alguns aspectos da síndrome do ovário policístico e endometriose, e nos homens, com a melhora dos parâmetros seminais como a concentração de espermatozoides, morfologia, motilidade e qualidade seminal (Rojansky *et al.*, 1992; Lerchbaum e Obermayer-Pietsch, 2012). Recentemente, evidências vêm sido reportadas na literatura demonstrando esse papel. Um grupo de pesquisadores da Dinamarca, que estuda o tema de forma aprofundada, demonstrou a

partir de um estudo clínico randomizado triplo cego, que a suplementação de VD em 300 homens com queixa de infertilidade e deficientes em VD obtiveram um aumento significativo nas taxas de gestações concebidas e nascidos vivos comparado ao grupo placebo, embora a suplementação utilizada não exerceu efeito significativo na melhora da qualidade dos parâmetros seminais avaliados nessa amostra. Essas considerações estabelecem novos aspectos envolvidos na complexa patogênese da infertilidade (Blomberg Jensen, 2018). O papel da VD na qualidade seminal é mediado a partir da expressão do VDR e das enzimas que a metabolizam nos tecidos reprodutivos masculinos, demonstrados crescentemente na literatura científica em estudos clínicos e experimentais com animais e humanos (De Angelis *et al.*, 2017).

A evidência da associação da VD com a reprodução humana foi obtida através de alguns estudos observacionais que indicavam uma variabilidade das taxas de gravidez após realizarem fertilização in vitro (IVF), de acordo com as estações do ano (Rojansky *et al.* 1992, Choudhary *et al.* 2005). As taxas mais altas de fecundação e gestação ocorriam durante a primavera e as mais baixas no outono. Essa variação foi relacionada com o tempo total de exposição ao sol e, nos países do hemisfério Norte, taxas reduzidas de ovulação e recepção do endométrio foram observadas durante os longos e escuros invernos. Por outro lado, as taxas de concepção de gestação aumentaram consideravelmente durante o verão (Grundmann e Von Versen-Hoynck, 2011). Nos homens, tem sido observada uma melhor qualidade do sêmen durante o verão, assim como uma correlação positiva entre as taxas de testosterona e VD (Rojansky *et al.*, 1992).

1.4 - A Vitamina D e a sua relação com a qualidade seminal

Um pré-requisito para um tecido ser alvo da ação da VD é a expressão do receptor VDR na membrana celular e, além dos níveis circulantes de 25(OH)D, a sua ação também depende da atividade das enzimas que a metabolizam, 25-hidroxilase e 1- α hidroxilase, que são expressas a partir dos genes, da família do citocromo *P450*, *CYP27B1* e *CYP2R1*, respectivamente. (Hammoud *et al.*, 2012; De Angelis *et al.*, 2017). Tanto as enzimas quanto o receptor são simultaneamente expressos nos testículos, nas células de Sertoli, de Leydig, nas células germinativas, nos espermatozoides e nas células epiteliais que revestem o trato reprodutor masculino (Rojansky *et al.*, 1992; Wehr *et al.*, 2010; Ramlau-Hansen *et al.*, 2011). Isso pode indicar que elas modulam a resposta local da vitamina D, o que pode ser confirmado através da constatação de altas concentrações de 25(OH)D e

1,25(OH)₂D₃ nos testículos e epidídimos comparado com outros órgãos após a injeção de VD em estudos experimentais com animais (Choudhary *et al.*, 2003; Choudhary *et al.*, 2005; Blomberg Jensen *et al.*, 2010).

Os genes *CYP27B1* e *CYP2R1*, assim como as enzimas 25-hidroxilase e 1- α ,hidroxilase, possuem maior expressão nos testículos quando comparadas a outros tecidos (Haussler *et al.* 2011, Castro 2011). O CYP2R1 é expresso tanto nas células de Leydig quanto nas células germinativas, e isso tem sido observado em estudos com humanos, onde os testículos de pacientes com problemas na espermatogênese apresentaram menor expressão desse gene (Castro 2011, Eskenazi *et al.* 2005). Além disso, eles também apresentavam níveis séricos de 25(OH)D menores que os homens normozoospermicos. Portanto, isso sugere que a ação do CYP2R1 no testículo é importante para o metabolismo sistêmico da VD (Foresta *et al.*, 2011). Essa hipótese é atraente pois mostra que a expressão relativa do CYP2R1 em humanos é maior no testículo do que no fígado e a metabolização da VD no testículo é importante para a homeostase da sua ação sistêmica (Addya *et al.*, 1991; Choudhary *et al.*, 2005).

A 25(OH)D possui funções biológicas no organismo todo, principalmente na homeostase e regulação intracelular do cálcio (Foresta *et al.*, 2011; Blomberg Jensen *et al.*, 2016). Seu papel no rim é no transporte intracelular do cálcio, o que envolve a concentração das enzimas TRPV5, TRPV6, calbindina, PMCA1 e NCX (Bouillon *et al.*, 2008; Hess *et al.*, 2011), e a importância da ação deste mineral na maturação dos espermatozoides humanos, assim como seu efeito na motilidade espermática é documentada na literatura (Eskenazi *et al.*, 2005; Wehr *et al.*, 2010). O efeito da vitamina D nos ductos deferentes e epidídimos podem ser comparados com os do rim, pois possuem a mesma origem. A hipótese que sustenta a relação da mesma função da VD nos dois órgãos é que a enzima (ou gene??) TRPV6 é expressa nos epidídimos, e com a sua inativação ocorre uma redução da absorção do cálcio no epidídimo, o que resulta em uma baixa motilidade do espermatozoide e da fertilidade em experimentos com ratos machos (Jensen, 2014).

1.5- A Vitamina D e sua relação com os hormônios sexuais

Os efeitos da VD e sua ação nos testículos, e consequentemente relação com a produção de hormônios sexuais tem sido investigada em estudos *in vitro* e *in vivo*, com animais e em humanos (Blomberg Jensen 2010, Pilz *et al.* 2011). Evidências preliminares realizadas com ratos demonstraram que os níveis circulantes de testosterona eram

significativamente menores em ratos que possuíam níveis séricos de VD baixos, comparados com os animais com níveis maiores de VD. No entanto, há controvérsias, com outros resultados que demonstram apenas uma tendência de redução dos níveis de testosterona com a baixa de vitamina D, porém, não de forma significativa. Esses achados sustentam a hipótese de que a VD pode ter uma influência na regulação dos níveis séricos de testosterona, embora os mecanismos de ação não estão ainda definidos. Os estudos sugerem um papel na regulação da testosterona, através de ações genômicas da VD nas células de Leydig (Sonnenberg *et al.*, 1986; Inpanbutr *et al.*, 1996; De Angelis *et al.*, 2017).

Estudos clínicos experimentais ainda são poucos, porém, evidências em estudos com humanos encontraram que o nível sérico de testosterona sofre influência de fatores como idade, Índice de massa corporal (IMC) e níveis séricos de VD (Hammoud *et al.*, 2012). Alguns estudos realizados com o objetivo de avaliar se existe uma influência dos níveis séricos de 25(OH)D e os níveis circulantes de testosterona livre não encontraram um resultado significativo positivo neste defecho (Ramlau-Hansen *et al.*, 2011; Chin *et al.*, 2015), no entanto existem controvérsias. Pesquisadores austríacos realizaram um estudo randomizado controlado com homens adultos saudáveis com o objetivo de avaliar se a suplementação de vitamina D melhoraria os níveis séricos de testosterona total. Eles encontraram um aumento significativo dos níveis séricos desse hormônio no grupo suplementado, comparado ao grupo placebo (Pilz *et al.*, 2011). Além do mais, existem estudos que demonstram uma correlação positiva entre os níveis séricos de testosterona com níveis mais elevados de VD (Anic *et al.*, 2016). Contudo, além da associação positiva com a testosterona total, algumas evidências sugerem uma correlação positiva também com o SHBG, (do inglês: *sex hormone-binding globulin*), sugerindo que a VD pode influenciar as concentrações totais de testosterona, de forma indireta, a partir do SHBG. (Lerchbaum *et al.*, 2014) Logo, a literatura ainda é inconsistente no que diz respeito a associação dos níveis séricos de 25(OH)D e os hormônios sexuais masculinos.

Mediante a este contexto, identificamos a necessidade de elucidar a influência dos níveis séricos de VD no sistema reprodutor masculino, especificamente na função testicular a partir da qualidade seminal e dos hormônios sexuais em homens com normozoospermia e com alterações nos parâmetros de qualidade seminal.

2.1 - OBJETIVO GERAL

O objetivo do presente estudo consiste em avaliar a influência dos níveis séricos de 25(OH) D nos parâmetros seminais e hormônios sexuais em homens adultos.

2.2 – Objetivos específicos

1. Correlacionar os níveis séricos de 25(OH)D com os parâmetros avaliados na análise seminal microscópica, tais como concentração, motilidade e morfologia;
2. Comparar as concentrações de 25(OH)D entre homens com diagnóstico de normozoospermia e homens com qualquer alteração nos parâmetros seminais;
3. Verificar a correlação entre os níveis séricos de 25(OH)D com os hormônios sexuais (LH, FSH, testosterona total, testosterona livre e SHBG);
4. Avaliar a influência dos níveis séricos de 25(OH)D nos parâmetros seminais, considerando as variáveis de confusão que podem impactar a qualidade seminal, tais como IMC, fumo, idade, álcool, varicocele, testosterona total e testosterona livre.

3- METODOLOGIA

3.1. *Desenho do estudo*

Trata-se de um estudo observacional retrospectivo de corte transversal realizado a partir da análise dos prontuários de pacientes atendidos em um centro de Andrologia e Fertilidade Masculina de referência, localizado na cidade de São Paulo. Foram selecionados para o estudo indivíduos que procuraram o serviço para avaliação da fertilidade, checkup geral, disfunção sexual e para realizar a cirurgia de vasectomia, no período entre 2007 e 2018. A assinatura do Termo de Consentimento Livre Esclarecido foi dispensada por se tratar de um estudo retrospectivo. O Anexo 1 se refere ao modelo da carta de pedido de despesa ao Comitê de Ética da Universidade De São Paulo, órgão que aprovou a realização do estudo (CAAE 48393715.9.0000.0065).

3.2. *Amostra populacional*

No total, foram analisados 508 prontuários de pacientes do sexo masculino, adultos (idade entre 18 e 60 anos), que tinham realizados os exames de análise seminal, dosagens séricas de 25(OH)D e hormônios sexuais. Todas as análises foram selecionadas dentro do período de 6 meses e antes de se iniciar qualquer tipo de terapêutica. Segue abaixo os critérios de seleção adotados para se obter uma amostra de pacientes com a função testicular preservada:

- Critérios de exclusão: Presença de alterações genéticas, como síndromes que afetam a função testicular, mutações que afetam a fertilidade como fibrose cística, microdeleção no cromossomo, alteração no cariótipo, histórico prévio de câncer submetido a tratamento de radioterapia e quimioterapia, exames que foram dosados fora do período de 6 meses, pacientes que não possuíam todos as dosagens (sêmen, vitamina D e hormônios sexuais), presença de infecção nos órgãos reprodutivos no momento em que realizou a análise seminal e com idade abaixo de 18 anos e acima de 60 anos, pacientes que possuíam graves disfunções testiculares, que afetavam a função testicular, como iatrogenia, criptoquirdia, hipogonadismo grave (testosterona abaixo de 150ng/dl), pacientes que realizaram cirurgia de vasectomia, uso recente de drogas ilícitas que atrofiam o testículo, uso de hormônios e anabolizantes.

Os pacientes foram, então divididos em 2 grupos, considerando o diagnóstico da análise seminal, para primeiramente avaliar se havia diferença das concentrações de VD neste desfecho.

Figura 2 – Diagrama de seleção da amostra

Os grupos foram denominados de acordo com o resultado da análise seminal: grupo normozoospermia (NZG), composto por pacientes com diagnóstico seminal de normozoospermia, ou seja, amostras com parâmetros seminais iguais ou acima do percentil 5% de normalidade descrito no manual da Organização Mundial da Saúde (WHO, 2010), definido como mínimo necessário para reprodução natural em até um ano de tentativas; o grupo com alterações seminais (SAG) foi composto por pacientes com um ou mais parâmetros seminais abaixo do valor mínimo necessário para normalidade:

Crítérios do Grupo SAG:

- Concentração <15 milhões/ml: Oligozoospermia
- Motilidade progressiva <32%: Astenozoospermia
- Morfologia espermática <4%: Teratozoospermia

Além disso, foram considerados variáveis de controle que poderiam influenciar as variáveis resposta, como presença de tabagismo, uso de álcool, varicocele, obesidade a partir do Índice de Massa Corporal (WHO 2010) (IMC kg/m²), índice de resistência à insulina (HOMA-IR) e colesterol total (mg/dl). Para obter os dados relacionados as variáveis de confusão, tais como tabagismo, uso de álcool, prática de atividade física e presença de varicocele, foi utilizado a partir de um questionário sim/não. Foram considerados tabagistas os pacientes que responderam ser fumantes, e aqueles que deixaram de fumar até um ano do período da avaliação. O uso de álcool foi considerado nos pacientes que responderam fazer uso de bebida alcoólica semanal. O diagnóstico de varicocele foi realizado a partir da avaliação por um urologista especializado.

A classificação de VD foi realizada de acordo com as diretrizes da Sociedade Americana de Endocrinologia (2011) (Holick *et al.*, 2011), sendo considerado níveis de deficiências os pacientes com dosagens abaixo de 20ng/ml, insuficiente entre 20,1 e 29,9ng/ml e suficientes níveis acima de 30ng/ml.

3.3. Análises seminais e laboratoriais

Todas as análises seminais foram realizadas no laboratório da Androscience – Centro de Referência em Andrologia, Criopreservação e Reprodução Masculina. Os exames laboratoriais foram realizados em laboratórios e centros diagnósticos escolhidos pelos pacientes, em estabelecimentos que atendiam aos requisitos de qualidade. Foram considerados para o estudo os níveis séricos de 25(OH)D, LH, FSH, testosterona livre e total e SHBG. O índice HOMA-IR foi obtido utilizando a seguinte fórmula:

$$\text{HOMA-IR} = [\text{glicose jejum (nmol/L)} * \text{insulina jejum (}\mu\text{U/mL)}] / 22.5].$$

A (tabela 1 Anexo 2) ilustra as metodologias de dosagens utilizadas.

3.3.1 Coleta de amostra seminal

As amostras de sêmen foram obtidas por masturbação, após um período de 2 a 7 dias de abstinência ejaculatória, de acordo com WHO 2010,(WHO, 2010) em frasco de

polipropileno estéril e descartável, em área anexa ao laboratório. Uma alíquota da amostra fresca foi submetida ao espermograma convencional para a rotina do laboratório, e, em seguida, o restante foi utilizado para os testes funcionais do estudo.

3.3.2. Avaliação microscópica das variáveis espermáticas

Após a avaliação das variáveis macroscópicas, a amostra foi manualmente homogeneizada, agitando-se cuidadosamente o frasco coletor por cerca de cinco segundos. A determinação destas variáveis será obtida pela análise de alíquota de sêmen homogeneizado. Foram adicionados 5 microlitros (μ l) da amostra em câmara de Makler (Sperm counting Chamber, Sefi-Medical Instruments, Israel) para observação em microscópio com aumento de 20 vezes (x) (Eclipse E400, Nikon, Japão).

Os seguintes aspectos microscópicos foram avaliados: número total de espermatozoides móveis progressivos (milhões), número total de espermatozoides móveis (milhões), número total de espermatozoides (milhões), concentração de espermatozoides (milhões/ml), motilidade progressiva (%), motilidade total (%)(WHO 2010).

3.3.3. Concentração espermática

A concentração espermática foi determinada em câmara de Makler, sendo utilizada alíquota de 5 μ l de amostra e coberta por lâmina reticulada, apropriada para a câmara em questão. Foi contado o número de espermatozoides móveis e imóveis presentes em três fileiras não consecutivas, contendo 10 quadrados cada uma, utilizando-se microscópio de contraste de fase (Nikon- aumento: 200x, Japão) A concentração espermática foi determinada pela média das três fileiras, expressa em milhões de espermatozoides por ml de sêmen (10^6 /ml).

$$\text{Concentração espermática} = (10^6/\text{ml}) = \text{N}^\circ \text{ de espermatozoides móveis} + \text{imóveis}$$

Quanto à concentração de espermatozoides, o limite de referência adotado foi de acima de 15 milhões de espermatozoides/ml ($10^6 \times \text{ml}$) para ser classificado como normozoospermia. O número será expresso em milhões de espermatozoides por ml de ejaculado.

3.3.4. Motilidade espermática

Foram avaliadas a motilidade qualitativa e quantitativa. A motilidade quantitativa foi realizada utilizando-se a câmara de Markler e microscópio de contraste de fase (aumento: 200x). Uma alíquota de 5µl da amostra foi adicionada na câmara sob lamínula e realizada a avaliação de 100 espermatozoides. Este mesmo procedimento foi repetido uma vez, e nos casos de diferença superior a 10%, uma terceira análise foi realizada. O valor final definido pela multiplicação do número de espermatozoides móveis por 100, dividido pela concentração espermática. O resultado foi expresso em porcentagem.

Quanto a motilidade qualitativa, os espermatozoides então foram classificados em:

- Motilidade progressiva: Espermatozoides móveis com progressão;
- Motilidade não-progressiva: Espermatozoides imóveis sem progressão;
- Imóveis: Espermatozoides imóveis

A motilidade espermática total foi calculada a partir da soma das motilidades progressiva e não progressiva (WHO 2010). O limite de referência para a motilidade progressiva é de 32% (porcentagem que indica a relação entre número de espermatozoides progressivos e número de espermatozoides total), abaixo disso é considerada a condição de Astenozoospermia, onde existe uma motilidade do espermatozoide, prejudicando a sua capacidade de fecundar o óvulo.

3.3.5. Morfologia espermática

A forma dos espermatozoides foi analisada os critérios estabelecidos segundo OMS e Kruger (Kruger *et al.*, 1986; Lu *et al.*, 2010). Segundo a OMS, os espermatozoides foram classificados como normais quando apresentam cabeça oval, superfície lisa e regular, com acrossoma compreendendo de 40-70% da área da cabeça com menos de dois vacúolos. A peça intermediária deve ser delgada, regular, com eixo alinhado à cabeça e sem citoplasma residual. A cauda deve ter aproximadamente 45µm e mesmo calibre por toda a sua extensão. Para a classificação segundo Kruger (1986) (Kruger *et al.*, 1986), foram considerados normais os espermatozoides com cabeças de forma oval, lisa e regular, dimensões entre 5 a 6µm de comprimento e 2,5 a 3,5µm de largura e o acrossoma regular, ocupando de 40 a 70% do segmento cefálico. Os espermatozoides com deformidade da peça intermediária foram considerados anormais, assim como aqueles que apresentaram gota citoplasmática remanescente que compreendesse mais da metade do tamanho da cabeça do espermatozoide. Em relação à cauda, será considerada normal quando esta se

apresentar levemente mais fina que a porção intermediária, não enrolada e com aproximadamente 45µm de comprimento. O resultado foi expresso em percentagem de espermatozoides ovais normais. A OMS determina valores acima de 4% como normais.

3. 4- *Análise estatística*

Inicialmente, as amostras foram categorizadas de acordo com o grupo (NZG e SAG), apresentando as variáveis: idade, sedentarismo, uso de álcool, hábito de fumar, ocorrência de varicocele, IMC, % de gordura corporal, HOMA-IR, colesterol total e os parâmetros seminais e hormonais. Para os dados qualitativos foram realizados cálculos de frequências e porcentagens. Para os dados quantitativos foram calculadas as médias, desvio padrão (DP), valores mínimos (min) e máximo (máx.), e comparadas entre si pelo teste de Mann-Whitney.

Logo, com o objetivo de avaliar as correlações entre os níveis séricos de VD e os parâmetros seminais e hormonais, foi utilizado o teste de correlação de Spearman. Na primeira etapa desta análise, foi avaliada a correlação entre a VD e todos os parâmetros seminais e os hormônios sexuais.

Para avaliar se a influência da VD (variável explicativa), acontece de forma independente das demais variáveis consideradas, nas variáveis resposta (parâmetros seminais e hormonais), foi realizado um modelo de regressão linear multivariada. As seguintes variáveis explicativas também foram consideradas: colesterol total (mg/dl), IMC (kg/m²), idade (anos), testosterona total (ng/dl), HOMA-IR, varicocele, álcool e fumo. O ajuste dos modelos foi verificado por meio da análise dos resíduos. Quando esta análise apontou desvios grosseiros das suposições de igualdade de variâncias e normalidade, a análise foi refeita considerando o logaritmo natural da variável resposta.

A linearidade foi avaliada por gráficos de regressão parcial e pelo gráfico de resíduos em relação aos valores preditos. Também foi avaliado se houve independência dos resíduos e homocedasticidade, avaliado pela estatística Durbin-Watson e por inspeção visual de um gráfico de resíduos versus valores preditos não padronizados, respectivamente. A multicolinearidade foi avaliada por valores de tolerância. A suposição de normalidade foi verificada por um gráfico Q-Q e por teste padrão formal pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. Foi utilizado como erro do tipo I menor ou igual a 5% para decisão de diferenças estatisticamente significantes. A análise foi feita com o auxílio dos aplicativos: SPSS® 23 para MAC e Minitab- versão 17.

4 RESULTADOS

4.1.1 – *Característica da amostra*

No total, a amostra final foi composta por 260 pacientes, e foram divididos de acordo com os diagnósticos dos resultados da análise seminal. Logo, os pacientes com alterações seminais compuseram o grupo SAG (N=135) e os pacientes com diagnóstico de normalidade compuseram o grupo normozoospermia NZG (N=125). A tabela 1 demonstra as características clínicas, metabólicas e laboratoriais da amostra. A média de idade encontrada no grupo SAG foi de $38,73 \pm 8,45$ e no grupo NZG de $37,96 \pm 8,77$, logo não houve diferença significativa entre os grupos, o que reforça a homogeneidade desta variável na amostra. Quanto as dosagens séricas de 25(OH)D, pacientes com alterações nos diagnósticos seminais possuem concentrações significativamente menor comparado aos pacientes com normozoospermia ($25,18 \pm 8,90$ e $30,06 \pm 12,01$ ng/ml, respectivamente; $P < 0,001$), como demonstra o gráfico na Figura 3. A prevalência de deficiência de vitamina D foi significativamente maior nos pacientes do SAG comparados com o NZG (33,5% in SAG e 24,8% in NZG, $P = 0,001$). Somente 25% dos pacientes do SAG possuíam níveis suficientes de vitamina D, contra 42,4% no grupo com normozoospermia.

A prevalência de sobrepeso e obesidade foi significativamente maior nos pacientes do SAG comparados com o NZG (77,2% no SAG e 54,7% no NZG; $P = 0,001$), assim como a média dos níveis séricos de insulina ($10,12 \pm 6,42$ no SAG e $8,58 \pm 5,79$ no NZG; $P = 0,054$). A incidência do uso de álcool e tabagismo foram parecidos em ambos os grupos (54,5% no SAG e 61,2%; $P = 0,334$ e 17,6% no SAG e 16,5%; $P = 0,829$ respectivamente), e a frequência de varicocele foi exatamente a mesma nos dois grupos (55%). Não foram encontradas diferenças significativa entre as concentrações de colesterol total e HOMA-IR entre os grupos ($P = 0,734$ e $P = 0,071$, respectivamente).

Considerando as análises hormonais, as concentrações de testosterona total e livre foram menores nos pacientes do SAG quando comparados aos do NZG ($463,84 \pm 177,91$ no SAG e $522,99 \pm 195,40$ no NZG; $P = 0,019$ e $9,88 \pm 4,07$ no SAG e $14,22 \pm 33,38$ no NZG; $P = 0,018$, além do mais, eles também apresentam maiores níveis de FSH comparados aos pacientes normozoospermicos ($6,17 \pm 6,59$ no SAG e $4,31 \pm 3,22$ no NZG, $P = 0,018$).

Tabela 1: Resumo descritivo da amostra e comparação entre os grupos

	SAG (n=135)	NZG (n=125)	Valor P
Idade (anos), média $\pm$ DP (min-máx.)	38,73 $\pm$ 8,45(19,0-59,0)	37,96 $\pm$ 8,77(18,0-60,0)	0,615
25(OH)D (ng/ml), média $\pm$ DP (min-max)	25,18 $\pm$ 8,90(7,0-68,0)	30,06 $\pm$ 12,01(9,0-75,0)	P<0,001
Suficiente (acima 30,1ng/ml) N, % *	34,0; 25,1	49,0; 42,4	
Insuficiente (20,1-30ng/ml) N, % *	56,0; 41,5	45,0; 32,8	
Deficiente (abaixo 20ng/ml) N, % *	45,0; 33,4	31,0; 24,8	
IMC (kg/m ³), média $\pm$ DP (min-máx.)**	27,72 $\pm$ 4,16 (17,3-40,75)	26,63 $\pm$ 3,62(20,8-36,9)	0,013
Desnutrido N, %	1,0; 0,9	-	
Eutrofia, N %	23,0; 21,9	44,0; 45,3	
Sobrepeso, N %	54,0; 51,4	39,0; 40,2	
Obeso, N%	27,0; 25,8	14,0; 14,5	
Presença de varicocele N; % sim	56/ 102; 55,0	56/ 102; 55,0	1,000
Tabagista N, % sim	18/ 102; 17,6	16 / 97; 16,5	0,829
Uso de álcool N, % sim	55 / 101; 54,5	60 / 98; 61,2	0,334
Insulina (μ U/ML), média $\pm$ DP (min-máx.)	10,12 $\pm$ 6,42 (2,2-40)	8,58 $\pm$ 5,79 (2,0-29,0)	0,054
HOMA IR, média $\pm$ DP (min-máx.)	2,25 $\pm$ 1,42 (0,46-8-39)	1,98 $\pm$ 1,50 (0,2-8,19)	0,071
Colesterol total (mg/dl), média (min-máx.)	199,04 $\pm$ 39,21(103-297)	197,33 $\pm$ 40,74(90-304)	0,734
Parâmetros seminais, média $\pm$ DP (min-máx.)			
Volume (ml)	3,116 $\pm$ 1,85 (0,25-10,0)	2,88 $\pm$ 1,54(0,50-8,50)	0,244
Num total de espermatozoide móveis (10 ⁶)	64,75 $\pm$ 107,21(0,0-559,0)	197,12 $\pm$ 178,67(11,0-1152,0)	P< 0,001
Num total de espermatozoide (10 ⁶)	112,75 $\pm$ 171,32(0,0-866,70)	282,39 $\pm$ 236,42(1,50-1440,0)	P< 0,001
Concentração (10 ⁶ /ml)	40,34 $\pm$ 66,69(0,0-577,80)	111,09 $\pm$ 105,12(15,0-800,0)	P< 0,001
Num total de esperm. móveis progressivos (10 ⁶)	22,05 $\pm$ 50,69(0,0-426,0)	117,98 $\pm$ 120,67(6,93-748,0)	P< 0,001
Motilidade progressiva total (%)	16,67 $\pm$ 14,11(0,0-65,0)	50,87 $\pm$ 11,01(32,0-75,0)	P< 0,001
Motilidade total (%)	38,05 $\pm$ 25,36(0,0-80,0)	69,01 $\pm$ 10,75(15,0-90,0)	P< 0,001
Parâmetros hormonais, média $\pm$ DP (min-max)			
LH(μ U/L)	4,50 $\pm$ 2,91(0,08-19,20)	3,88 $\pm$ 1,70(0,06-10,10)	0,203
FSH(μ U/L)	6,17 $\pm$ 6,59(0,22-41,50)	4,31 $\pm$ 3,22(0,29-23,90)	0,018
Testosterona total (ng/dL)	463,84 $\pm$ 177,91(164,0-1123,0)	522,99 $\pm$ 195,40(175,0-1231,0)	0,019
Testosterona livre (ng/dl)	9,88 $\pm$ 4,07(3,56-32)	14,22 $\pm$ 33,38(3,70-370,0)	0,018
SHBG	37,57 $\pm$ 48,43(6,70-413,0)	36,27 $\pm$ 38,07(8,0-415,0)	0,641

*De acordo com o guidelines da Sociedade Americana de Endocrinologia (2011)

**De acordo com WHO 2010 guidelines

Figura 3: Box-plot dos concentrações séricas de 25(OH)D nos pacientes com alterações seminais (SAG) vs pacientes com normozoospermia (NZG)

Os níveis séricos da 25(OH)D não estão associados ao sedentarismo ($P=0,256$), ao uso de álcool ($P=0,104$), ao hábito de fumar ($P=0,500$) e à ocorrência de varicocele ($P=0,734$). O valor do coeficiente de correlação de Spearman da Vitamina D e o colesterol total é $r=0,013$ ($P=0,850$), entre HOMA e Vitamina D é $r=-0,21$ ($P=0,009$) e entre a Vitamina D e o IMC é $r=-0,073$ ($P=0,330$). Portanto, não há correlação significativa entre a concentração da Vitamina D e o colesterol total e há correlação negativa entre o HOMA e a Vitamina D.

4.1.2 – Parâmetros seminais e hormônios sexuais

4.2.1- 25(OH)D e qualidade seminal

A partir das análises realizadas, obtivemos uma correlação positiva entre as dosagens de 25(OH)D e os parâmetros seminais, exceto com os parâmetros de volume e pH. Os valores obtidos, detalhados nas Figuras de 4 a 11 com os diagramas de dispersão e os coeficientes correspondentes, demonstram que há correlação significativa entre todos os parâmetros seminais considerados e os níveis séricos de 25(OH)D, exceto o número total de espermatozoides, para o qual foi obtido um valor de P marginal. A correlação

mais forte encontrada foi observada entre a motilidade total e os níveis de VD ($r=0.225$; $P=0.001$). O valor de P adotado foi $\geq 0,05$.

Uma reta de regressão foi adicionada aos gráficos com o objetivo de melhor visualização das tendências nas nuvens de pontos. Essas ilustrações sugerem uma tendência do aumento dos parâmetros seminais avaliados com o aumento da concentração da 25(OH)D.

Figura 4 – Diagrama de dispersão do parâmetro seminal de número total de espermatozoides móveis progressivos e níveis séricos de 25(OH)D

Legenda: r = coeficiente de Spearman

Figura 5 – Diagrama de dispersão do parâmetro seminal número total de espermatozoides móveis e níveis séricos de 25(OH)D

Legenda: r = coeficiente de Spearman

Figura 6 – Diagrama de dispersão do parâmetro seminal motilidade total progressiva e níveis séricos de 25(OH)D

Legenda: r = coeficiente de Spearman

Figura 7 – Diagrama de dispersão do parâmetro seminal número total de espermatozoides e níveis séricos de 25(OH)D

Legenda: r = coeficiente de Spearman

Figura 8 – Diagrama de dispersão do parâmetro seminal Motilidade Total e os níveis séricos de 25(OH)D

Legenda: r = coeficiente de Spearman

Figura 9 – Diagrama de dispersão do parâmetro seminal Concentração espermática e níveis séricos de 25(OH)D

Legenda: r= coeficiente de Spearman

Figura 10 – Diagrama de dispersão do parâmetro seminal Morfologia, pelas normas da OMS 2010 e os níveis séricos de 25(OH)D

Legenda: r= coeficiente de Spearman

Figura 11 – Diagrama de dispersão do parâmetro seminal Morfologia, pelo critério de Kruger e os níveis séricos de 25(OH)D

Legenda: r = coeficiente de Spearman

4.2.2 – Vitamina D e hormônios sexuais

A partir dos testes de correlação de Spearman aplicados, entre os níveis séricos de 25(OH)D e os hormônios sexuais, identificamos que não houve correlação significativa entre a vitamina D e os hormônios LH, FSH, SHBG e testosterona livre. A única correlação significativa encontrada foi entre a testosterona total, a qual teve uma correlação positiva ($P=0,016$). O respectivo diagrama de dispersão está ilustrado na Figura 12.

Figura 12: Diagrama de dispersão dos níveis séricos de Testosterona Total e 25(OH)D

Legenda: r = coeficiente de Spearman

4.2.3 –Modelo de Regressão linear – análise multivariada

Após analisar as correlações entre os níveis séricos de VD e os desfechos, foi realizado outra análise para verificar se a influência dos níveis de 25(OH)D prevalecia mediante as demais variáveis que poderiam influenciar também os parâmetros seminais e hormonais. Para a construção dos modelos de regressão, foram adotados como variáveis resposta os parâmetros seminais e hormônios sexuais. 25(OH) D, índice HOMA-IR, colesterol total, IMC, idade, testosterona total, fumo, varicocele foram consideradas como possíveis variáveis explicativas/confusão. Considerando os hormônios sexuais como variáveis resposta, foi considerado como possíveis variáveis explicativas o IMC, idade, HOMA-IR e colesterol total.

Logo, a tabela 2 ilustra os resultados da análise de regressão linear multivariada realizada com os parâmetros seminais como variável resposta. As variáveis idade, IMC, colesterol total, HOMA-IR, álcool e fumo não apresentaram influência significativa que possa pressupor as variáveis 25(OH)D, Testosterona total e varicocele foram significativos na análise preliminar. Os achados do estudo indicam que os níveis séricos de 25(OH)D exerce uma influência positiva e independente das demais variáveis entre os parâmetros seminais de concentração, número total de espermatozoides móveis ($\beta=0,174 \pm SE 1,053$), concentração ($\beta= 0,255 \pm SE 0,577$), número total de espermatozoides móveis progressivos ($\beta=0,215 \pm SE 0,685$), e morfologia por Kruger ($\beta=0,210 \pm SE 0,020$). Quanto ao parâmetro número total de espermatozoide, tanto os níveis de 25(OH)D e varicocele foram significativos na análise, sendo que a primeira variável exerce influência positiva ($\beta=0,153 \pm SE 1,500$) e a segunda negativa ($\beta=0,147 \pm SE 30,279$). Contudo, os resultados demonstram que em pacientes com o mesmo grau de varicocele, o aumento de uma unidade de 25(OH)D pode influenciar 1,53% no parâmetro seminal Número Total de espermatozoides. E assim sucessivamente. No entanto, a partir desses resultados, o estudo sugere que os níveis séricos de 25(OH)D exerce uma influência positiva significativa nos parâmetros seminais de qualidade do espermatozoide, especialmente nos parâmetros de concentração, motilidade e morfologia.

Considerando as análises dos hormônios sexuais, os níveis séricos de 25(OH)D influenciaram negativamente as concentrações de testosterona total ($\beta=0,167 \pm SE 1,162$) porém não de forma independente, uma vez que o IMC também exerceu uma influência negativa nessa análise (Tabela 3). Logo, esses dados demonstram que as variáveis IMC e

vitamina D influenciam os níveis séricos de testosterona total, sendo que o aumento de uma unidade de IMC ocasiona uma redução de 9,62ng/dl na concentração de testosterona total ($p=0,002$) e com o aumento de uma unidade de Vitamina D exerce uma influência do aumento do nível de testosterona em 2,751 ng/dl unidade.

Os níveis de VD não influenciaram as dosagens séricas de LH, FSH, SHBG e testosterona livre.

Tabela 2: Contribuição de cada variável analisada nos parâmetros seminais, coeficiente β e valor de P obtidos a partir dos modelos de Regressão Linear Multivariada

Constante	N total Esperm.	Concentração	N Total Esperm. Móveis	N Total de Esperm. Móveis Prog	Motilidade Total Prog	Motilidade Total	Morfologia (OMS)	Morfologia (Kruger)
25(OH)D	0,153(0,033)	0,255(0,000)	0,174(0,015)	0,215(0,003)	0,175(0,015)	0,175(0,013)	0,147(0,053)	0,210(0,006)
Idade	-0,050(0,480)	0,035(0,615)	-0,048(0,499)	-0,041(0,565)	-0,042(0,554)	-0,100(0,152)	0,007(0,930)	-0,031(0,681)
IMC	-0,047(0,522)	0,024(0,739)	-0,41(0,580)	-0,055(0,455)	-0,007(0,925)	-0,052(0,470)	0,045(0,569)	0,056(0,468)
Testosterona Total	0,075(0,294)	0,079(0,262)	0,092(0,200)	0,077(0,281)	0,189(0,009)	0,202(0,004)	0,176(0,021)	0,143(0,058)
Colesterol Total	0,055(0,439)	0,079(0,261)	0,047(0,510)	0,016(0,817)	0,056(0,436)	0,015(0,829)	0,015(0,840)	0,041(0,582)
HOMA IR	-0,047(0,509)	0,059(0,405)	-0,057(0,427)	-0,034(0,632)	0,007(0,924)	0,067(0,341)	0,071(0,363)	-0,033(0,582)
Álcool	-0,163(0,069)	-0,162(0,066)	-0,149(0,095)	-0,095(0,289)	-0,039(0,661)	-0,150(0,087)	0,057(0,547)	-0,013(0,891)
Tabagismo	-0,003(0,973)	-0,046(0,605)	-0,119(0,906)	-0,043(0,630)	-0,046(0,615)	-0,020(0,816)	-0,064(0,506)	0,045(0,638)
Varicocele	-0,147(0,039)	0,100(0,152)	0,106(0,135)	0,107(0,132)	-0,054(0,448)	-0,088(0,206)	-0,037(0,626)	0,061(0,411)

A: indicadores: 25(OH)D, varicocele, HOMA-IR, idade, álcool, testosterona

total, IMC e fumo; B: variáveis explicativas: (N total de esperm: Número total de espermatozoide); Concentração; (Número total de esperm. Móveis: Número total de espermatozoide móveis), (Motilidade total prog.: Motilidade total progressiva); Motilidade total; Morfologia por OMS; Morfologia por Kruger.

a. $P \text{ value} \leq 0.05$.

Legenda: N Total Esperm Mov: Número Total de Espermatozóide Móveis; N Total Esperm: Número Total de Espermatozoide; N Total Esperm Mov Prog: Espermatozoides Móveis Progressivos; OMS: Organização Mundial da Saúde

Tabela 3: Contribuição de cada variável analisada nos parâmetros hormonais, coeficiente β e valor de P obtidos a partir dos modelos de Regressão Linear Multivariada

Constante	Total Testosterone	FSH	SHBG
25(OH)D	0,167(0,019)	0,123(0,112)	0,098(0,177)
Idade	-0,096(0,180)	0,127(0,111)	0,247(0,001)
IMC	-0,225(0,002)	0,106(0,175)	-0,265(0,000)
Colesterol Total	0,004(0,956)	-0,179(0,022)	-0,023(0,754)

- Variáveis: 25(OH)D, idade, IMC, Colesterol Total
- Variáveis respostas: Testosterona Total; Testosterona livre, LH; FSH; SHBG
- Valor de $p \leq 0,05$

5 – DISCUSSÃO

A elevada prevalência da deficiência de vitamina D na população mundial vem sido debatida e investigada profundamente na comunidade científica, além dos seus efeitos clássicos no metabolismo ósseo que são bem estabelecidos na literatura (Holick, 2008; Overton *et al.*, 2015). Sua aplicação clínica é muito presente no diagnóstico, tratamento e prevenção do raquitismo, osteopenia e osteoporose (Holick, 2008; Holick *et al.*, 2011). No entanto, nas últimas décadas, uma pandemia de deficiência de vitamina D vêm sido apontada. No presente estudo foi encontrado uma prevalência de 68,0% de níveis insuficientes de 25(OH)D, de acordo com o guideline da Sociedade Americana de Endocrinologia (Holick *et al.*, 2011), em homens que procuraram o serviço de Andrologia. Isso tem ampliado a investigação e o entendimento sobre suas ações genômicas e não genômicas no organismo, inclusive no trato reprodutivo masculino (Jensen, 2014). Contudo, o seu mecanismo de ação no sistema reprodutor ainda não é bem elucidado, mas tem sido consideravelmente investigada e reportada na literatura (Blomberg Jensen *et al.*, 2010; Blomberg Jensen *et al.*, 2011; Ramlau-Hansen *et al.*, 2011; Blomberg Jensen e Dissing, 2012; Hammoud *et al.*, 2012; Anic *et al.*, 2016; Abbasihormozi *et al.*, 2017; De Angelis *et al.*, 2017).

Além do mais, os resultados apresentados demonstram uma correlação positiva que exerce a 25(OH)D no parâmetros de qualidade seminal analisados. A correlação mais robusta encontrada foi com a motilidade total do espermatozoide ($r = 0.225$; $p = 0.001$), dado que corrobora com os achados publicados na literatura. Abbasihormozi *et al.* (Abbasihormozi *et al.*, 2017) e Hammond *et al.* também concluíram que baixos níveis séricos de VD estavam relacionados com uma baixa qualidade seminal (Hammoud *et al.*, 2012). Essa relação de influência principalmente nos parâmetros de motilidade, concentração e morfologia do espermatozoide condiz com os resultados de estudos publicados recentemente (Blomberg Jensen *et al.*, 2010; Foresta *et al.*, 2011; Blomberg Jensen *et al.*, 2016).

Blomberg Jensen *et al.*, um dos pesquisadores mais relevantes nesse tema, têm conduzido diversos estudos para elucidar a ação da VD sobre o sistema reprodutor masculino (Blomberg Jensen *et al.*, 2010; Blomberg Jensen *et al.*, 2011; Blomberg Jensen e Dissing, 2012; Blomberg Jensen *et al.*, 2016). Em um de seus estudos, o grupo de pesquisadores monitoraram as concentrações de VD e os parâmetros seminais por 1 ano

em 300 homens dinamarqueses. O achado mais significativo no estudo foi a correlação positiva entre os níveis séricos de VD e os parâmetros de motilidade total e progressiva do espermatozoide (Blomberg Jensen *et al.*, 2016). As evidências sugerem que os metabólitos da VD agem de forma indireta nas células reprodutivas masculinas, mediando a regulação intracelular de cálcio, mineral envolvido em inúmeras reações nessas células. A forma ativa, $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ se liga ao VDR e induz ao rápido aumento da concentração de cálcio intracelular no espermatozoide humano (Blomberg Jensen e Dissing, 2012).

Baseado nesse contexto, a nossa hipótese é que existe um potente mecanismo de ação que promove a motilidade do espermatozoide a partir da ativação do VDR regulando a homeostase do cálcio no trato reprodutivo, elevando a concentração deste mineral no fluido seminal, influenciando na motilidade espermática e estimulando a reação acrossômica na maturação da célula reprodutiva. Além disso, é possível que exista uma autorregulação e produção de VD intratesticular, uma vez que as células testiculares expressam as enzimas 25-hidroxilase e 1α -hidroxilase (Aquila *et al.*, 2009; Blomberg Jensen *et al.*, 2012). Tais evidências sustentam o papel da VD na função espermática e abrem caminhos para novas perspectivas de estudo dos mecanismos bioquímicos de ação dos metabólitos da VD na espermatogênese, e, principalmente nas células de Leydig e Sertoli.

Do mesmo modo, o VDR também é expresso nas células de Leydig, nas células imaturas de Sertoli, células germinativas, nas espermátides e no espermatozoide (Corbett *et al.*, 2006; Aquila *et al.*, 2008; Blomberg Jensen e Dissing, 2012; Blomberg Jensen *et al.*, 2012). Especificamente no espermatozoide humano, os estudos demonstram que o VDR é encontrado em diversas regiões, inclusive na cabeça (Corbett *et al.*, 2006; Aquila *et al.*, 2008; Blomberg Jensen e Dissing, 2012; Blomberg Jensen *et al.*, 2012), na região pós acrossômica (Aquila *et al.*, 2008; Blomberg Jensen e Dissing, 2012), pescoço (Aquila *et al.*, 2008; Blomberg Jensen e Dissing, 2012), e/ou na peça intermediária (Corbett *et al.*, 2006; Blomberg Jensen e Dissing, 2012). A enzima 25-hidroxilase, mediada pelo gene CYP2R1, ambos são altamente expressos no tecido da próstata, vesícula seminal, epidídimos e testículo, particularmente nas células de Leydig, espermátides e espermátides (Blomberg Jensen e Dissing, 2012). A constatação de que as demais enzimas e genes mediadores, tais como a 1α -hidroxilase, mediada pelo gene CYP27B1, e a 24-hidroxilase, mediada pelo gene CYP24A1 também possuem ações metabólicas e são expressas nos órgãos do sistema reprodutor masculino, assim como no espermatozoide, respaldando a relevância do papel da VD na espermatogênese e

consequentemente nos parâmetros de qualidade seminal.

Um grupo de pesquisadores na China, Ding C et al. (Ding *et al.*, 2016), realizaram um estudo experimental com animais, de forma a identificar o impacto da suplementação da vitamina D, na sua forma ativa $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, na espermatogênese em ratos diabéticos. Eles afirmam que a glicose elevada no sangue é deletéria as células germinativas, afetando a quantidade e a qualidade do sêmen. No entanto, os grupos que receberam a suplementação com doses normais e altas de vitamina D tiveram os efeitos adversos amenizados de forma significativa, comparado ao grupo controle, principalmente nos parâmetros de concentração e motilidade espermática. Eles concluíram que a vitamina D desempenha um papel protetor nas funções testiculares e reprodutivas masculinas contra os efeitos deletérios induzidos pelo diabetes. Possivelmente, esse efeito é causado pela atenuação da inflamação, e inativação da cascata de reação das caspases que regulam a apoptose. Além disso, eles sugerem que a vitamina D pode ser um promissor coadjuvante no tratamento das disfunções testiculares em diabéticos (Ding *et al.*, 2016).

No presente estudo encontramos uma correlação negativa entre a $25(\text{OH})\text{D}$ e o HOMA-IR, sugerindo uma possível influência da VD no metabolismo glicídico. Além disso, VD e IMC influenciaram os níveis séricos de testosterona. Entretanto, a relação entre os níveis de $25(\text{OH})\text{D}$ e a produção de testosterona total em homens com função testicular preservada ainda está sob investigação e não foi elucidada. Saha et al (2018) demonstrou em um estudo randomizado controlado que a suplementação de VD e cálcio não tiveram efeitos significativos no aumento das concentrações de testosterona sérica em homens jovens, no entanto, eles não estudaram esse desfecho em homens mais velhos, que possuem maior queda desse hormônio. (Saha e Goswami, 2018) Por outro lado, os achados do presente estudo demonstra uma correlação positiva entre os níveis de VD e testosterona total, mesmo controlada com outras variáveis essa correlação prevaleceu.

Contudo, novos estudos são necessários para elucidar os mecanismos fisiológicos envolvidos nas ações da VD na célula de Leydig, na função testicular e consequentemente na espermatogênese., Paralelamente, fica claro a necessidade de se identificar os níveis séricos de VD ideais para a melhor função testicular e espermatogênese, uma vez que os níveis consagrados nos *guidelines* foram estabelecidos para a saúde óssea (Holick *et al.*, 2011).

Fatores que poderiam influenciar a qualidade seminal e o potencial fértil do homem como tabaco, álcool e varicocele foram rejeitados como variáveis de confusão pelas análises previamente realizadas para o modelo de regressão, na análise multivariada.

Porém, é importante esclarecer que a não padronização da metodologia utilizada pelos laboratórios para aferir os níveis séricos de 25(OH)D e a elevada prevalência de varicocele, embora tenha sido neutralizada estatisticamente, são considerados vieses do estudo. A limitação da padronização da metodologia aplicada em estudos clínicos é uma dificuldade comumente encontrada pelos pesquisadores em um estudo retrospectivo. Barake et al (2012) demonstraram que a variação do ensaio utilizado para aferir os níveis de 25(OH)D no plasma possui um impacto significativo no resultado, podendo ter uma variação média de 5ng na mesma amostra, dependendo da metodologia aplicada, e consequentemente influenciando no diagnóstico.

Todavia, há fortes evidências reportadas previamente na literatura que a VD possui uma ação endócrina e/ou parácrina no testículo, mediada pelo VDR tanto no espermatozoide, quanto nas células de Leydig, Sertoli e espermatogonia. Logo, o atual estudo sugere que a investigação diagnóstica e adequação dos níveis séricos de VD deve ser considerada em homens que buscam tratamento para fertilidade. Além disso, futuras investigações incluindo estudos randomizados controlados duplo cego *in vitro* e *in vivo* são necessários para esclarecer a fisiopatologia da vitamina D no sistema reprodutor masculino.

6 CONCLUSÃO

A partir do presente estudo, podemos concluir que:

- 1- A vitamina D influenciou positivamente na função testicular, uma vez que existe correlação positiva entre os níveis séricos de vitamina D e parâmetros que determinam o potencial fértil masculino, como a , concentração, motilidade e morfologia espermática;
- 2- Os níveis de VD foram menores no grupo de pacientes com alterações seminais (SAG) do que nos pacientes do grupo normozoospermico (NZG)
- 3- A VD correlacionou-se positivamente com os níveis séricos de testosterona total
- 4- Os níveis de VD exercem uma influencia positivamente nos parâmetros seminais de qualidade do espermatozoide de forma independente, especialmente nos parâmetros de concentração, motilidade e morfologia.
- 5- O IMC, o fumo, a idade, o consumo de álcool e a presença de varicocele não foram fatores de confusão nos resultados obtidos.

1 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBASIHORMOZI, S. et al. Association of vitamin D status with semen quality and reproductive hormones in Iranian subfertile men. *Andrology*, v. 5, n. 1, p. 113-118, Jan 2017.

ADDYA, S. et al. Characterization of a female-specific hepatic mitochondrial cytochrome P-450 whose steady-state level is modulated by testosterone. *Biochemistry*, v. 30, n. 34, p. 8323-30, Aug 27 1991.

ANIC, G. M. et al. Association between serum 25-hydroxyvitamin D and serum sex steroid hormones among men in NHANES. *Clin Endocrinol (Oxf)*, v. 85, n. 2, p. 258-66, Aug 2016.

AQUILA, S. et al. Human male gamete endocrinology: 1alpha, 25-dihydroxyvitamin D3 (1,25(OH)2D3) regulates different aspects of human sperm biology and metabolism. *Reprod Biol Endocrinol*, v. 7, p. 140, Nov 30 2009.

AQUILA, S. et al. Human sperm anatomy: ultrastructural localization of 1alpha,25-dihydroxyvitamin D receptor and its possible role in the human male gamete. *J Anat*, v. 213, n. 5, p. 555-64, Nov 2008.

BARAKE et al. 25-Hydroxyvitamin D Assay Variations and Impact on Clinical Decision Making. *J Clin Endocrinol Metab*, v.97, n.3, p.835-843, Mar 2012.

BLOMBERG JENSEN, M. et al Effects of vitamin D supplementation on semen quality, reproductive hormones and live birth rate: A randomized clinical trial. *J Clin Endocrinol Metab*, v.103, n.3, p. 870-881, Mar 2018.

BLOMBERG JENSEN, M. et al. Vitamin D is positively associated with sperm motility and increases intracellular calcium in human spermatozoa. *Hum Reprod*, v. 26, n. 6, p. 1307-17, Jun 2011.

BLOMBERG JENSEN, M.; DISSING, S. Non-genomic effects of vitamin D in human spermatozoa. *Steroids*, v. 77, n. 10, p. 903-9, Aug 2012.

BLOMBERG JENSEN, M. et al. Vitamin D deficiency and low ionized calcium are linked with semen quality and sex steroid levels in infertile men. *Hum Reprod*, v. 31, n. 8, p. 1875-85, Aug 2016.

BLOMBERG JENSEN, M. et al. Expression of the vitamin D metabolizing enzyme CYP24A1 at the annulus of human spermatozoa may serve as a novel marker of semen quality. *Int J Androl*, v. 35, n. 4, p. 499-510, Aug 2012.

BLOMBERG JENSEN, M. et al. Vitamin D receptor and vitamin D metabolizing enzymes are expressed in the human male reproductive tract. *Hum Reprod*, v. 25, n. 5, p. 1303-11, May 2010.

BOIVIN, J. et al. International estimates of infertility prevalence and treatment-seeking: potential need and demand for infertility medical care. *Hum Reprod*, v. 22, n. 6, p. 1506-12, Jun 2007.

BOUILLON, R. et al. Vitamin D and human health: lessons from vitamin D receptor null mice. *Endocr Rev*, v. 29, n. 6, p. 726-76, Oct 2008.

BOUILLON, R.; OKAMURA, W. H.; NORMAN, A. W. Structure-function relationships in the vitamin D endocrine system. *Endocr Rev*, v. 16, n. 2, p. 200-57, Apr 1995.

BRAZEROL, W. F. et al. Serial ultraviolet B exposure and serum 25 hydroxyvitamin D response in young adult American blacks and whites: no racial differences. *J Am Coll Nutr*, v. 7, n. 2, p. 111-8, Apr 1988.

CASTRO, L. C. G. D. O sistema endocrinológico Vitamine D. *Arquivo Brasileiro Endocrinologia e Metabolismo*, Brasília, v. 55, p. 566-75, 2011.

CHIN, K. Y.; IMA-NIRWANA, S.; WAN NGAH, W. Z. Vitamin D is significantly associated with total testosterone and sex hormone-binding globulin in Malaysian men. *Aging Male*, v. 18, n. 3, p. 175-9, 2015.

CHOUDHARY, D. et al. Comparative expression profiling of 40 mouse cytochrome P450 genes in embryonic and adult tissues. *Arch Biochem Biophys*, v. 414, n. 1, p. 91-100, Jun 1 2003.

CHOUDHARY, D. et al. Expression patterns of mouse and human CYP orthologs (families 1-4) during development and in different adult tissues. *Arch Biochem Biophys*, v. 436, n. 1, p. 50-61, Apr 1 2005.

CORBETT, S. T.; HILL, O.; NANGIA, A. K. Vitamin D receptor found in human sperm. *Urology*, v. 68, n. 6, p. 1345-9, Dec 2006.

DE ANGELIS, C. et al. The role of vitamin D in male fertility: A focus on the testis. *Rev Endocr Metab Disord*, v. 18, n. 3, p. 285-305, Sep 2017.

DING, C. et al. Vitamin D supplement improved testicular function in diabetic rats. *Biochem Biophys Res Commun*, v. 473, n. 1, p. 161-167, Apr 22 2016.

ESKENAZI, B. et al. Antioxidant intake is associated with semen quality in healthy men. *Hum Reprod*, v. 20, n. 4, p. 1006-12, Apr 2005.

EVERITT, B. S. Book reviews : Fisher LD, van Belle G 1993: *Biostatistics: a methodology for the health sciences*. New York: John Wiley and Sons. 991pp. £62.00 (\$86.50). ISBN 0 471 584657. *Statistical Methods in Medical Research*, v. 3, n. 1, p. 103-103, 1994. Disponível em: < <http://journals.sagepub.com/doi/abs/10.1177/096228029400300107> >.

FORESTA, C. et al. Bone mineral density and testicular failure: evidence for a role of vitamin D 25-hydroxylase in human testis. *J Clin Endocrinol Metab*, v. 96, n. 4, p. E646-52, Apr 2011.

GRUNDMANN, M.; VON VERSEN-HOYNCK, F. Vitamin D - roles in women's reproductive health? *Reprod Biol Endocrinol*, v. 9, p. 146, Nov 2 2011.

HAGENAU, T. et al. Global vitamin D levels in relation to age, gender, skin pigmentation and latitude: an ecologic meta-regression analysis. *Osteoporos Int*, v. 20, n. 1, p. 133-40, Jan 2009.

HAMMOUD, A. O. et al. Association of 25-hydroxy-vitamin D levels with semen and hormonal parameters. *Asian J Androl*, v. 14, n. 6, p. 855-9, Nov 2012.

HESS, R. A. et al. Estrogen and its receptors in efferent ductules and epididymis. *J Androl*, v. 32, n. 6, p. 600-13, Nov-Dec 2011.

HOLICK, M. F. Vitamin D deficiency. *N Engl J Med*, v. 357, n. 3, p. 266-81, Jul 19 2007.

HOLICK, M. F. Vitamin D: a D-Lightful health perspective. *Nutr Rev*, v. 66, n. 10 Suppl 2, p. S182-94, Oct 2008.

HOLICK, M. F. et al. Evaluation, treatment, and prevention of vitamin D deficiency: an Endocrine Society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab*, v. 96, n. 7, p. 1911-30, Jul 2011.

HOSSEINPANAH, F. et al. The effects of air pollution on vitamin D status in healthy women: a cross sectional study. *BMC Public Health*, v. 10, p. 519, Aug 29 2010.

INPANBUTR, N. et al. Effect of vitamin D on testicular CaBP28K expression and serum testosterone in chickens. *Biol Reprod*, v. 54, n. 1, p. 242-8, Jan 1996.

JENSEN, M. B. Vitamin D and male reproduction. *Nat Rev Endocrinol*, v. 10, n. 3, p. 175-86, Mar 2014. ISSN 1759-5037 (Electronic)
1759-5029 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24419359> >.

KRUGER, T. F. et al. Sperm morphologic features as a prognostic factor in in vitro fertilization. *Fertil Steril*, v. 46, n. 6, p. 1118-23, Dec 1986.

LEFEVRE, M. L. Screening for vitamin D deficiency in adults: U.S. Preventive Services Task Force recommendation statement. *Ann Intern Med*, v. 162, n. 2, p. 133-40, Jan 20 2015.

LERCHBAUM, E.; OBERMAYER-PIETSCH, B. Vitamin D and fertility: a systematic review. *Eur J Endocrinol*, v. 166, n. 5, p. 765-78, May 2012.

LERCHBAUM, E. et al. Serum vitamin D levels and hypogonadism in men. *Andrology*, v. 2, n. 5, p. 748-54, Sep 2014.

LOOKER, A. C. et al. Serum 25-hydroxyvitamin D status of adolescents and adults in two seasonal subpopulations from NHANES III. *Bone*, v. 30, n. 5, p. 771-7, May 2002.

LOPES, V. M. et al. Highly prevalence of vitamin D deficiency among Brazilian women of reproductive age. *Arch Endocrinol Metab*, v. 61, n. 1, p. 21-27, Jan-Feb 2017.

LU, J. C.; HUANG, Y. F.; LU, N. Q. [WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen: its applicability to andrology laboratories in China]. *Zhonghua Nan Ke Xue*, v. 16, n. 10, p. 867-71, Oct 2010.

MAEDA, S. S. Análise dos fatores determinantes para as concentrações de 25 hidroxivitamina D em diferentes populações da cidade de São Paulo: The São Paulo Vitamin D Evaluation Study (SPADES). 2010.

MEDICINE, I. O. Dietary Reference Intakes for Calcium and Vitamin D. Washington, DC: The National Academies Press, 2011. 1132 ISBN 978-0-309-16394-1. Disponível em: < <https://www.nap.edu/catalog/13050/dietary-reference-intakes-for-calcium-and-vitamin-d>

NORMAN, A. W. From vitamin D to hormone D: fundamentals of the vitamin D endocrine system essential for good health. *Am J Clin Nutr*, v. 88, n. 2, p. 491s-499s, Aug 2008.

OVERTON, E. T. et al. Vitamin D and Calcium Attenuate Bone Loss With Antiretroviral Therapy Initiation: A Randomized Trial. *Ann Intern Med*, v. 162, n. 12, p. 815-24, Jun 16 2015.

PETERS, B. S. et al. The influence of breakfast and dairy products on dietary calcium and vitamin D intake in postpubertal adolescents and young adults. *J Hum Nutr Diet*, v. 25, n. 1, p. 69-74, Feb 2012.

PILZ, S. et al. Effect of vitamin D supplementation on testosterone levels in men. *Horm Metab Res*, v. 43, n. 3, p. 223-5, Mar 2011.

PREMAOR, M. O. et al. Hypovitaminosis D and secondary hyperparathyroidism in resident physicians of a general hospital in southern Brazil. *J Endocrinol Invest*, v. 31, n. 11, p. 991-5, Nov 2008.

PROSSER, D. E.; JONES, G. Enzymes involved in the activation and inactivation of vitamin D. *Trends Biochem Sci*, v. 29, n. 12, p. 664-73, Dec 2004.

RAMLAU-HANSEN, C. H. et al. Are serum levels of vitamin D associated with semen quality? Results from a cross-sectional study in young healthy men. *Fertil Steril*, v. 95, n. 3, p. 1000-4, Mar 1 2011.

ROJANSKY, N.; BRZEZINSKI, A.; SCHENKER, J. G. Seasonality in human reproduction: an update. *Hum Reprod*, v. 7, n. 6, p. 735-45, Jul 1992.

SAHA, S.; GOSWAMI, R. Vitamin D and calcium supplementation, skeletal muscle strength and serum testosterone in young healthy adult males: Randomized control trial. v. 88, n. 2, p. 217-226, Feb 2018.

SILVA, B. C. et al. [Prevalence of vitamin D deficiency and its correlation with PTH, biochemical bone turnover markers and bone mineral density, among patients from ambulatories]. *Arq Bras Endocrinol Metabol*, v. 52, n. 3, p. 482-8, Apr 2008.

SONNENBERG, J. et al. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 treatment results in increased choline acetyltransferase activity in specific brain nuclei. *Endocrinology*, v. 118, n. 4, p. 1433-9, Apr 1986.

VALIMAKI, V. V. et al. Serum estradiol, testosterone, and sex hormone-binding globulin as regulators of peak bone mass and bone turnover rate in young Finnish men. *J Clin Endocrinol Metab*, v. 89, n. 8, p. 3785-9, Aug 2004.

VAN SCHOOR, N. M.; LIPS, P. Worldwide vitamin D status. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, v. 25, n. 4, p. 671-80, Aug 2011.

VELA, G. et al. Advances and controversies in assisted reproductive technology. *Mt Sinai J Med*, v. 76, n. 6, p. 506-20, Dec 2009.

WEBB, A. R.; KLINE, L.; HOLICK, M. F. Influence of season and latitude on the cutaneous synthesis of vitamin D3: exposure to winter sunlight in Boston and Edmonton will not promote vitamin D3 synthesis in human skin. *J Clin Endocrinol Metab*, v. 67, n. 2, p. 373-8, Aug 1988.

WEHR, E. et al. Association of vitamin D status with serum androgen levels in men. *Clin Endocrinol (Oxf)*, v. 73, n. 2, p. 243-8, Aug 2010.

World Health Organization. Obesity:Global database on Body Mass Index
Acesso :http://apps.who.int/bmi/index.jsp?introPage=intro_3.htm 2m 25/08/2018

ANEXO 1 – CARTA DE PEDIDO DE DISPENSA DO TCLE

COMITÊ DE ÉTICA NA PESQUISA (CEP)

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

Solicito a dispensa da aplicação do Termo de consentimento livre e esclarecido do projeto de pesquisa intitulado “Níveis séricos de Vitamina D e sua Relação com Hormônios Esteroidais, Parâmetros Nutricionais e Seminais em Homens Avaliados por Infertilidade”, com a seguinte justificativa:

1. Trata-se de pesquisa retrospectiva com uso dos dados de prontuários de pacientes e laudos de exames.

junho de 2015

São Paulo, 24 de

Atenciosamente,

Dr. Jorge Hallak
Pesquisador Responsável

ANEXO 2 – TABELAS

Tabela 1 – Metodologia de dosagens utilizadas para mensurar as variáveis hormonais e a 25(OH)D

Variável	Metodologia
25(OH)D(ng/ml)	Eletroquimioluminescência; Imensaio competitivo quimioluminescente (ECLIA); Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)
Testosterona total (ng/dL)	Ensaio imunofluorométrico; Eletroquimioluminescência
FSH (μU/L)	Ensaio imunofluorométrico; Eletroquimioluminescência
LH (μU/L)	Ensaio imunofluorométrico; Eletroquimioluminescência
SHBG (nmol/L)	Ensaio imunofluorométrico; Eletroquimioluminescência
Insulina (μUI / mL)	Ensaio eletroquimioluminométrico
Glicose (mg/dl)	Calorimetria enzimática

Tabelas de 2 a 4 demonstram que as variáveis fumo e varicocele e sua correlação com parâmetros seminais e hormonais.

Tabela 2- Valores de p obtidos na correlação das distribuições dos parâmetros seminais em fumantes e em não fumantes

Parâmetros seminais	p
Nº total espermatozoide moveis	0,490
Nº total espermatozoide	0,479
Concentração espermática	0,437
Nº total espermatozoides moveis prog.	0,746
Motilidade total progressive	0,702
Motilidade total	0,765
Morfologia por OMS	0,878

Tabela 3- Valores de p obtidos na correlação das distribuições das testosteronas livre e total em fumantes e em não fumantes

Hormônios sexuais	p
Testosterona total (ng/dL)	0,349
Testosterona livre (ng/dL)	0,251

Tabela 4- Valores de p obtidos na correlação das distribuições dos parâmetros seminais nos grupos com e sem varicocele

Parâmetros seminais	p
Nº total espermatozoide moveis	0,348
Nº total espermatozoide	0,126
Concentração espermática	0,417
Nº total espermatozoides moveis prog.	0,249
Motilidade total progressive	0,289
Motilidade total	0,116
Morfologia por OMS	0,856

Tabela 5- Valores de p obtidos na correlação das distribuições das testosteronas livre e total nos grupos com e sem varicocele

Parâmetros seminais	p
Testosterona total (ng/dL)	0,379
Testosterona livre (ng/dL)	0,992

ANEXO 3 – PREMIAÇÕES

PRÊMIO RECEBIDO NO 42º CONGRESSO ANUAL DA SOCIEDADE
AMERICANA DE ANDROLOGIA (ASA) - MIAMI- FL/ USA 2017

PRÊMIO RECEBIDO NO 43º CONGRESSO ANUAL DA SOCIEDADE
AMERICANA DE ANDROLOGIA (ASA) - PORTLAND - OR/ USA 2018 –
BREAKING ABSTRACTS ORAL PRESENTATION