JULIANA ANDRIETTA

**INFLUÊNCIA DA EXPOSIÇÃO OCUPACIONAL À POLUIÇÃO ATMOSFÉRICA
DE ORIGEM VEICULAR NOS PARÂMETROS SEMINAIS DE
CONTROLADORES DE TRÁFEGO NA REGIÃO METROPOLITANA DE SÃO
PAULO**

DISSERTAÇÃO APRESENTADA À FACULDADE
DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO
PAULO PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE
MESTRE EM CIÊNCIAS

PROGRAMA DE UROLOGIA

ORIENTADOR: DR. JORGE HALLAK

SÃO PAULO

2010

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Andrietta, Juliana

Influência da exposição ocupacional à poluição atmosférica de origem veicular nos parâmetros seminais de controladores de tráfego na Região Metropolitana de São Paulo / Juliana Andrietta. -- São Paulo, 2010.

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

Orientador: Jorge Hallak.

Descritores: 1.Poluição atmosférica 2.Fertilidade 3.Espermatozóides
4.Creatina quinase 5.Radicais livres 6.Anticorpo anti-espermatozóide

USP/FM/DBD-352/10

Dedico esta dissertação aos meus pais, José Carlos e Solange, pelo exemplo, apoio, incentivo, paciência e por estarem sempre ao meu lado ajudando a superar os obstáculos que a vida impõe.

Dedico também ao meu marido Rafael, por ser antes de tudo meu melhor amigo, por não me deixar desistir e por sempre levantar o meu astral quando estou desanimada.

Agradeço...

Primeiramente a Deus pelo dom da vida, pela saúde e pela inteligência que me proporcionou.

Ao Prof. Paulo Saldiva, por abrir as portas do Laboratório de Poluição e permitir que esta pesquisa fosse realizada.

Ao Prof. Miguel Srougi e ao Prof. Homero Bruschini, por incentivar e dar oportunidade à pesquisa científica.

Ao Dr. Jorge Hallak, pela orientação, oportunidade e incentivo de realizar mais esta etapa e poder crescer profissionalmente.

À FAPESP pelo auxílio financeiro ao projeto.

À CAPES pela bolsa de estudos.

Aos meus irmãos de coração, Mariangela Missaglia, Elisa e Fernando Taboada e Michelle Gavirole pela amizade, pelo companheirismo, ombro amigo e por me incentivarem a seguir em frente.

As amigas e companheiras de andrologia Marcia Hage, Rosa Alice Monteiro, Maribe Salam Marcos e aos novos amigos Mariana Martini Agatão, Adriana Pires, Karina Andrighetti de Oliveira, Daniela Foltran Januário, Jôse Mára de Brito, Ana Júlia Lichtenfels, Luis Afonso Pires, Heloísa Bueno, Eliane Tigre, Dolores Rivero, Luis Pereira, Rodolfo de Paula Veira, Beatriz Saraiva-Romanholo, Francine Maria de Almeida, Ana Cristina Mielli, Luciano Belotti, Mac Gayver da Silva, Priscila Ovioni, Ana Paula e Marcos Garcia Martins por todo apoio, cooperação e amizade.

Aos alunos de iniciação científica Viviane Yamachira e Aroldo Ban por me ajudarem a enfrentar as dificuldades e abraçarem o projeto.

Às secretárias do Laboratório de Poluição Maria Dalva Santana, Márcia Bento e do Departamento de Urologia, Maria Iones Souza Vancini e Inisabete Salles da Silva, Elisa de Arruda Cruz da Silva, da Pós-Graduação, Maria Madalena Quintino, do Ambulatório e Fátima da Informática, que sempre estiveram prontas para ajudar.

À Adriana Sañudo pela ajuda nas análises estatísticas.

Às queridas Laís, Isabel, Tânia e Tais por todo o auxílio, informações e carinho.

A todos do Laboratório de Poluição Atmosférica Experimental, que direta ou indiretamente estiveram presentes na realização deste projeto.

...Muito Obrigada!

Para Ser Grande

*Para ser grande, sê inteiro: nada
Teu exagera ou exclui.
Sê todo em cada coisa. Põe quanto és
No mínimo que fazes.
Assim em cada lago a Lua toda
Brilha, porque alta vive.*

*Ricardo Reis
(Fernando Pessoa)*

SUMÁRIO

Lista de Figuras

Lista de Quadros

Lista de Tabelas

Lista de Abreviaturas

Lista de Siglas

Lista de Símbolos

RESUMO

SUMMARY

1. INTRODUÇÃO.....	2
1.1. Infertilidade	2
1.2. Causas de infertilidade masculina	3
1.3. Poluição Atmosférica e Saúde	4
1.3.1. Poluição na Região metropolitana de São Paulo	6
1.3.1.1. Material Particulado Fino	7
1.3.1.2. Dióxido de Nitrogênio	8
1.3.1.3. Ozônio	8
1.4. Toxicologia Reprodutiva	9
1.4.1. Estudos Experimentais	10
1.4.2. Estudos Epidemiológicos	11
1.5. Avaliação da fertilidade	12
1.5.1. Análise seminal	13
1.5.2. Creatina Quinase	14
1.5.3. Radicais Livres do Oxigênio	15
1.5.4. Anticorpos Anti-espermatozóides	17
2. OBJETIVOS	20
3. CASUÍSTICA E MÉTODOS	22
3.1. Características do estudo	22
3.1.1. Local do estudo	22
3.1.2. Cálculo amostral inicial	22
3.1.3. Seleção dos pacientes	23
3.1.3.1. Grupo Exposto	24
3.1.3.2. Grupo Controle	24
3.2. Anamnese e Exame Físico	24
3.3. Análise Hormonal	26

3.4. Análise Seminal	26
3.4.1. Coleta da amostra	26
3.4.2. Análise Macroscópica	27
3.4.3. Análise Microscópica	27
3.4.3.1. Concentração espermática	27
3.4.3.2. Motilidade espermática	28
3.4.3.3. Células redondas	29
3.4.3.4. Morfologia espermática	29
3.5. Teste para detecção de leucócitos	31
3.6. Anticorpo anti-espermatozóide	31
3.7. Determinação da atividade da enzima Creatina Quinase	33
3.7.1. Procedimento	34
3.7.2. Cálculos	35
3.8. Determinação dos níveis de Radicais Livres de Oxigênio	35
3.8.1. Procedimento	36
3.8.2. Cálculos	36
3.9. Dados de Poluição	37
3.10. Análise Estatística	39
4. RESULTADOS	41
5. DISCUSSÃO	52
5.1. Volume testicular	52
5.2. Hormônios	52
5.3. Parâmetros seminais	53
5.4. Leucócitos	55
5.5. Anticorpo anti-espermatozóide	56
5.6. Marcadores bioquímicos	57
5.6.1. Creatina Quinase	57
5.6.2. Radicais Livres de Oxigênio	57
5.7. Dados de poluição	59
5.8. Fatores de interferências	60
5.8.1. Idade	60
5.8.2. Tabagismo	62
5.9. Considerações finais	63
6. CONCLUSÃO	65
ANEXO A	67
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	74

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Região Metropolitana de São Paulo	6
Figura 2: Varicocele	25
Figura 3: Instrumentos para mensuração do volume testicular. (A) Orquidômetro de Prader. (B) Paquímetro	25
Figura 4: Câmara de contagem Makler e quadrado graduado em destaque.....	28
Figura 5: Morfologia espermática. A – espermatozóide normal, critério OMS. B – espermatozóide normal, critério estrito de Kruger.....	31
Figura 6: “Beads” aderido à região do pescoço do espermatozoides.....	32
Figura 7: Mapas gerados no software SURFER 8.0. A - mapa gerado pela extrapolação dos dados coletados pela CETESB. B- mapa com a localização geográfica dos pacientes e das estações da CETESB	38
Figura 8: Mapas de dispersão de poluentes no grupo exposto	46
Figura 9: Mapas de dispersão de poluentes no grupo controle	47

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Valores de referência para características seminais 33

Quadro 2: Padrões de qualidade do ar 39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1:	Número de filhos relatado nos grupos	42
Tabela 2:	Principais resultados obtidos na avaliação clínica urológica. A – Varicocele. B1 - Volume testicular - Orquidômetro (ml). B2- Volume testicular - Paquímetro (ml)	42 e 43
Tabela 3:	Média dos principais resultados da análise seminal nos grupos	44
Tabela 4:	Testes de função espermática	43
Tabela 5:	Resultados das análises hormonais (média $\pm$ DP)	45
Tabela 6:	Níveis de NO ₂ , O ₃ e MP _{2,5} nos grupos	45
Tabela 7:	Correlação entre poluentes, parâmetros seminais, volume testicular e hormônios	48
Tabela 8:	Dados dos fatores de interferência, idade e tabagismo. A – Análise da influência dos fatores nos parâmetros avaliados. B- Idade. C-Tabagismo	49 e 50

LISTA DE ABREVIATURAS

°C – graus Celsius

ΔA - mudança na absorbância

[C] - concentração

μg – micrograma

μm – micrômetro

$\mu\text{g}/\text{m}^3$ – micrograma por metro cúbico

$\mu\text{g}/\text{ml}$ – micrograma por mililitro

μl – microlitro

6-PG – 6-fosfogluconato

A – absorbância

ADP – adenosina difosfato

ATP – adenosina trifosfato

CK – do inglês *Creatine Kinase* (Creatina Quinase)

cm – centímetro

CO – monóxido de carbono

COV - compostos orgânicos voláteis

CPM - do inglês *Counts Per Minute* (fótons contados por minuto);

d – semi amplitude de IC

DBCP – dibromocloropropano

DDT – diclorodifeniltricloreto

DMSO – dimetil sulfóxido

DNA - do inglês *Deoxyribonucleic acid*

DP – Desvio Padrão

E - delta de extinção molar do substrato em 340 nm

FSH – Hormônio Folículo Estimulante

G-6-P – glicose-6-fosfato

G-6-PDH – glicose-6-fosfato desidrogenase

GnRH - Hormônio Regulador de Gonadotrofina

H_2O_2 – peróxido de hidrogênio

HC - hidrocarbonetos

HK - hexoquinase
HRV - variabilidade do ritmo cardíaco
HTF – *Human Tubal Fluid*
IC – Intervalo de Confiança
ICSI – injeção intracitoplasmática de espermatozóides
IU/l – unidades internacionais por litro
LH – hormônio luteinizante
LP - "lightpath", caminho óptico
LPMN - leucócitos polimorfonucleares
M – molar
mg - miligramas
min. – minutos
ml – mililitro
mm - milímetro
 mm^2 – milímetro quadrado
 mm^3 – milímetro cúbico
mmol/l – milimolar por litro
MP – Material Particulado
N – tamanho da população
NaCl – Cloreto de sódio
NAD - nicotinamida adenina dinucleotídeo
NADH - nicotinamida adenina dinucleotídeo desidrogenase
ng/dl – nanograma por decilitro
nm - nanômetro
NO – óxido de nitrogênio
 NO_2 – Dióxido de Nitrogênio
 NO_x –óxidos de nitrogênio
 O^- - ânion superóxido
 O_3 – Ozônio
 $\text{OH}^\cdot$ - radical hidroxila
OR – Valor tabelado da distribuição normal
p – proporção esperada na população

Pb – chumbo

PCBs - Bifenilpoliclorado

pg/ml – picograma por mililitro

Qtd – quantidade

ROS – do inglês Radical Oxygen Species (Espécies Reativas de Oxigênio)

rpm – rotações por minuto

SO – óxido de enxofre

SO₂ – dióxido de enxofre

SO_x – óxidos de enxofre

spz – espermatozóides

U – unidades

UTM - *Universal Transverse Mercator*

VA - volume da amostra

VFC – variabilidade de frequência cardíaca

vol./vol. – volume/volume

VT - volume total

VAPS - amostrador versátil de poluição do ar

LISTA DE SIGLAS

CAPPesq - Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa

CET – Companhia de Engenharia de Tráfego

CETESB - Companhia Ambiental do Estado de São Paulo

CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente

HC-FMUSP – Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

LP AE – Laboratório de Poluição Atmosférica Experimental

OMS – Organização Mundial de Saúde

RMSP – Região Metropolitana de São Paulo

SUS – Sistema Único de Saúde

LISTA DE SÍMBOLOS

$>$ - maior

$\geq$ - maior ou igual

$+$ - mais

$\pm$ - mais ou menos

$<$ - menor

$\%$ - porcentagem

$\times$ - vezes

Andrietta J. *Influência da exposição ocupacional a poluição atmosférica de origem veicular nos parâmetros seminais em controladores de tráfego na Região Metropolitana de São Paulo*. [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 2010.

RESUMO

INTRODUÇÃO: A Região Metropolitana de São Paulo é a mais populosa do Brasil. A grande frota veicular contribui para uma maior concentração de poluentes atmosféricos. Diversos poluentes podem interferir na fertilidade humana, alterando os principais parâmetros seminais. Este estudo teve como objetivo avaliar a influência dos níveis atuais de poluição atmosférica de origem veicular nos parâmetros seminais em controladores de tráfego.

MÉTODOS: Foram realizadas anamnese e avaliação clínica urológica (volume testicular, presença de varicocele, criptorquidia, má formações) em 62 controladores de tráfego da CET (grupo exposto) e 210 homens comprovadamente férteis do grupo de pré-vasectomia do ambulatório da urologia do HC-FMUSP (grupo controle). Os parâmetros seminais avaliados foram concentração, motilidade (quantitativa e qualitativa), morfologia pelos critérios da OMS e critério estrito de Kruger, teste para detecção de leucócitos e testes de função espermática, CK, ROS e anticorpo anti-espermatozóide. Parâmetros hormonais também foram avaliados. Avaliação de exposição à poluição foi realizada através da dispersão de poluentes registrado pela Cetesb, gerada pelo software SURFER 8.0. **RESULTADOS:** Os controladores de tráfego apresentaram volume testicular maior em relação ao grupo pré-vasectomia ($p < 0,001$). Quanto aos níveis de Estradiol ($p = 0,119$), LH ($p = 0,644$), FSH ($p = 0,140$) e Testosterona total ($p = 0,365$), ambos os grupos apresentaram valores dentro da normalidade. A concentração espermática apresentou-se homogênea nos grupos ($p = 0,395$); os controladores de tráfego apresentaram média de $124,9 \times 10^6/\text{ml}$ e os pré-vasectomia $110,1 \times 10^6/\text{ml}$. Os controladores de tráfego apresentaram motilidade quantitativa (total) reduzida (60%) em relação aos pré-vasectomia (65%) ($p = 0,047$). A motilidade qualitativa (progressiva) também se apresentou diminuída no grupo exposto ($p < 0,001$). As morfologias espermáticas tanto pelo critério da OMS (grupo exposto = 12%; grupo controle = 20%), quanto pelo critério estrito de Kruger (grupo exposto = 3%; grupo controle = 6%) estavam significativamente diminuídas no grupo exposto em relação ao controle ($p < 0,001$). O marcador de maturidade Creatina Quinase apresentou-se dentro da normalidade em ambos os grupos, porém maior no grupo controle ($p < 0,001$). Anticorpos anti-espermatozóides estavam elevados nos dois grupos, porém

não foi significativo ($p=0,382$). Radicais livres de oxigênio apresentaram-se em altas concentrações nos dois grupos, porém não foi significativo ($p=0,141$). CONCLUSÕES: A análise dos dados obtidos nessa pesquisa sugere que a poluição atmosférica exerce uma influência negativa sobre os parâmetros seminais motilidade e morfologia. Causa elevação dos níveis de ROS em todos os indivíduos, indicando perda da função espermática. Ainda demonstrou-se a elevação em todos os indivíduos dos níveis de anticorpos anti-espermatozóides, sugerindo que os poluentes teriam transposto a barreira hemato-testicular. O volume testicular do grupo exposto à poluição veicular apresentar-se maior em relação ao volume testicular do grupo controle nos leva a supor que isto se deva a uma reação inflamatória aos agentes poluidores. Apesar da diferença significativa na concentração de poluentes entre os grupos, uma correlação direta com parâmetros seminais não pôde ser demonstrada.

Descritores: poluição atmosférica, fertilidade, espermatozóides, creatina quinase, radicais livres, anticorpo anti-espermatozóide.

Andrietta J. *Influence of occupational exposure to vehicular air pollution on seminal parameters of traffic operators at Metropolitan Region of Sao Paulo*. [dissertation]. São Paulo: “Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo”; 2010.

SUMMARY

Metropolitan Region of Sao Paulo is the most populous of Brazil. The huge number of vehicles contributes for a higher concentration of air pollutants. Various pollutants can interfere in human fertility, altering the main seminal parameters. The aim of this study was to evaluate the influence of air pollution of vehicular origin on seminal parameters of traffic controllers. Clinical history and urological evaluation (testicular volume, presence of varicocele, cryptorchidism, bad formations) were carried out in 62 traffic controllers (exposed group) and 210 proven fertile men from the pre-vasectomy group of urologic clinic at Hospital of Clinics – University of Sao Paulo (control group). Seminal parameters evaluated were concentration, motility (quantitative and qualitative), morphology by WHO's criteria and Kruger's strict criteria, test for detection of leukocytes and tests of sperm function, CK, ROS and antisperm antibody. Hormonal parameters also were evaluated. Exposition to air pollution was analyzed through the dispersion of pollutants recorded by Cetesb, generated in the software SURFER 8.0. Traffic controllers presented bigger testicular volume than pre-vasectomy group ($p < 0,001$). Hormonal levels were at normal range in both groups; Estradiol ($p = 0,119$), LH ($p = 0,644$), FSH ($p = 0,140$) and Total Testosterone ($p = 0,365$). Sperm concentration was homogeneous in both groups ($p = 0,395$); traffic controllers presented mean of $124.9 \times 10^6/\text{ml}$ and pre vasectomy group $110.1 \times 10^6/\text{ml}$. The exposed group presented quantitative (total) motility (60%) diminished than control group (65%) ($p = 0,047$). The qualitative (progressive) motility was also diminished in the exposed group ($p < 0,001$). The sperm morphologies as by WHO's criteria (exposed group = 12%; control group = 20%), as by Kruger's strict criteria (exposed group = 3%; control group = 6%) were significantly diminished in the exposed group ($p < 0,001$). The sperm maturity marker Creatine Kinase was at normal range at both groups, but higher in the control one ($p < 0,001$). Antisperm antibodies was elevated in both groups, however it was not significant ($p = 0,382$). ROS presented higher concentrations in both groups, however it was not significant ($p = 0,141$). The facts presented in this study suggest that air pollution exercises negative effects on the seminal parameters motility and morphology. It causes elevation of ROS levels in all individuals, indicating loss

of sperm function. It also showed, elevation of antisperm antibodies levels, suggesting that pollutants would have transposed the blood-testis barrier. The testicular volume in the exposed group was higher than the testicular volume of the control group; we can suppose that it must occur due to an inflammatory reaction against the polluting agents. Although the significant difference in pollutants concentrations between groups, no direct correlation to seminal parameters could be demonstrated.

Descriptors: air pollution, fertility, spermatozoa, creatine kinase, ROS, antisperm antibodies.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Infertilidade

Saúde reprodutiva é a condição na qual o processo reprodutivo é atingido em estado físico, mental e social plenos (Michal *et al*, 1993).

Infertilidade é definida como a situação na qual um casal não consegue obter gravidez espontânea em um período de 12 meses, sem o uso de medidas contraceptivas. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), cerca de 85% dos casais concebem gravidez espontânea neste período. Se esta não for obtida dentro deste prazo, uma investigação para infertilidade deve ser feita (WHO, 1999). Aproximadamente 14% dos casais no mundo são inférteis. O homem participa como fator causal, isolado e conjugal em metade destes casos (Jardim *et al*, 1999).

As causas de infertilidade masculina podem ser classificadas em pré-testiculares, testiculares e pós-testiculares. As pré-testiculares são as alterações que ocorrem no sistema hormonal levando o homem a não produzir espermatozóides (spz) adequadamente. As testiculares são doenças do testículo propriamente dito. E as pós-testiculares abrangem problemas do sistema de ductos que transportam os gametas masculinos para o exterior (IPGO, 2005).

Com a introdução das técnicas de reprodução assistida, como a ICSI (injeção intracitoplasmática de espermatozóides) primeiramente divulgada por Palermo *et al* (1992) e técnicas especiais de recuperação de espermatozóides para o tratamento de infertilidade masculina grave e aos resultados promissores, e rapidamente difundidos por todo o mundo, pacientes antes considerados inférteis adquiriram a chance de serem pais geneticamente (Monzo *et al*, 2001).

1.2. Causas de infertilidade masculina

Entre as principais doenças que causam infertilidade masculina estão: varicocele, obstrução (adquirida/ congênita), infecção, disfunção ejacutória, problemas imunológicos, disfunções sexuais, agenesia dos vasos, gonadotoxinas (drogas/ radiação), aplasia das células germinativas, falência testicular primária, anomalias cromossomais, entre outras (McClure, 1998).

Nas últimas décadas, muitos estudos descreveram piora na qualidade seminal (Auger *et al*, 1995; Paulsen *et al*, 1996; Zorn *et al*, 1998; Gyllenborg *et al*, 1999; Liang *et al*, 2008; Shine *et al*, 2008; Feki *et al*, 2009). Na meta-análise de 61 publicações, Carlsen *et al* (1992) concluíram que o volume do ejaculado e a concentração reduziram em 26% e 50% respectivamente no período de 1938 a 1990. Nesse cenário, diversos podem ser os fatores que estão alterando os parâmetros seminais, como por exemplo, fatores comportamentais, como estresse crônico que levam à redução do número de espermatozóides, motilidade e morfologia normais. Fatores biológicos (vírus, microorganismos) e socioeconômicos (má nutrição, habitat degradado, obesidade, etc.) podem reduzir a função reprodutiva masculina. Fatores físicos também podem interferir na função reprodutiva, alterando os principais parâmetros seminais. No entanto, a interferência de fatores químicos (poluição) na saúde reprodutiva masculina é aleatória e pouco entendida (Paradisi *et al*, 2009).

Ainda permanecem dúvidas a esse respeito, porém há uma tendência em considerar fatores ambientais como uma possível explicação para as mudanças na qualidade seminal. Interações ambiente–ambiente, gene–ambiente, e gene–gene devem ser levadas em consideração, pois podem determinar a relação entre exposição a substâncias químicas e risco à saúde humana (Hauser *et al*, 2005).

1.3. Poluição Atmosférica e Saúde

Conforme a Resolução CONAMA (Conselho Nacional do Meio Ambiente) nº 3 de 28/06/1990 Artigo 1º, Parágrafo Único: “Entende-se como poluente atmosférico qualquer forma de matéria ou energia com intensidade e em quantidade, concentração, tempo ou características em desacordo com os níveis estabelecidos, e que tornem ou possam tornar o ar: I - impróprio, nocivo ou ofensivo à saúde; II - inconveniente ao bem-estar público; III - danoso aos materiais, à fauna e flora. IV - prejudicial à segurança, ao uso e gozo da propriedade e às atividades normais da comunidade”.

Estudos recentes mostraram que altas concentrações de material particulado (MP) no ar estão associadas a uma ampla gama de efeitos sobre a saúde humana, incluindo aumento de internações hospitalares (Braga *et al*, 1999; Braga *et al*, 2001) e visitas a unidades de emergência por patologia respiratória (Pope 3rd & Kanner, 1993; Lin *et al*, 1999). Entre os poluentes, o material particulado vem sendo associado a aumento no número de mortes de idosos e crianças por doenças cardiovasculares e respiratórias (Saldiva *et al*, 1994 e 1995; Gouveia, 1997; Braga, 1998; Miraglia, 2000).

Em São Paulo, o estudo de Pereira *et al* (1998) mostrou uma associação significativa entre variações agudas da poluição do ar e mortalidade fetal tardia, bem como evidências de aumento de carboxi-hemoglobina em paralelo às variações ambientais de monóxido de carbono. O estudo de Lin *et al* (2004) também associou aumentos nos níveis poluição do ar com aumento de mortes neonatais, provavelmente devido a problemas respiratórios, explicando os efeitos agudos.

De Paula Santos *et al* (2005) realizaram estudo de pressão arterial (24horas) e eletrocardiograma em 48 controladores de tráfego ocupacionalmente expostos a

poluição veicular, saudáveis, não fumantes, com idade entre 31–55 anos. O estudo mostrou aumento na concentração de poluentes primários foi associada a mudanças na pressão arterial e variabilidade do ritmo cardíaco (HRV). Porém não encontrados efeitos para PM₁₀ e dióxido de nitrogênio (NO₂).

No estudo de Arbex *et al* (2009) foi identificada uma clara associação entre poluição do ar e doença obstrutiva pulmonar crônica em indivíduos com 40 anos ou mais na cidade de São Paulo, Brasil.

Novaes *et al* (2010) mostraram que pessoas expostas a níveis altos de poluição derivada do tráfego, apresentam uma frequência maior de irritação ocular e instabilidade lacrimal.

Estudos experimentais do grupo do LPAE – Laboratório de Poluição Atmosférica Experimental, também relatam efeitos adversos no sistema cardio-pulmonar.

Mauad *et al* (2008) descreveram que níveis urbanos de poluição podem influenciar negativamente o crescimento do pulmão de camundongos, pois estes desenvolveram alterações significativas na estrutura alveolar e nas propriedades elásticas. Akinaga *et al* (2009) relatou que a exposição crônica a poluição ambiental na cidade de São Paulo, do nascimento a maioridade, induz fibrose e elastase nas artérias coronárias em camundongos Swiss saudáveis. No estudo de Lopes *et al* (2009), a exposição a níveis de MP relacionado a origem veicular pioram o desenvolvimento de enfisema em decorrência de doença proteolítica em ratos.

O estudo de Mazzoli-Rocha *et al* (2008) demonstrou que uma única dose baixa de partículas ambientais de origem veicular ou da queima de cana-de-açúcar

provoca alterações significativas na mecânica e histologia pulmonares em camundongos.

O estudo de Rivero *et al* (2005) indicou que a exposição a partículas ambientais promove alterações pulmonares e cardíacas em ratos saudáveis, mesmo quando marcadores celulares de inflamação sistêmica não estão alterados. De Brito (2010) mostrou que a exposição a diesel e biodiesel provoca aumento da variabilidade da frequência cardíaca (VFC), resposta inflamatória pulmonar, com infiltrado de neutrófilos e macrófagos e também inflamação sistêmica, com aumento de leucócitos e plaquetas em camundongos.

1.3.1. Poluição na Região Metropolitana de São Paulo

Em relação a Região Metropolitana de São Paulo (RMSP), que é o maior centro urbano do Brasil e da América Latina, e a sexta maior área urbana do mundo, que reúne 39 municípios (figura 1) e com mais de 19 milhões de habitantes (IBGE, 2007-2009), a deterioração da qualidade do ar é decorrente das emissões atmosféricas da frota registrada de aproximadamente 9,2 milhões de veículos. Os veículos são responsáveis por 98% das emissões de CO (monóxido de carbono), 97% de HC (hidrocarbonetos), 96% de NO_x (óxidos de nitrogênio), 40% de MP e 33% de SO_x (óxidos de enxofre) na atmosfera (CETESB, 2008).

Figura 1: Região Metropolitana de São Paulo

A qualidade do ar pode mudar em função das condições meteorológicas, que determinam uma maior ou menor diluição dos poluentes. Sendo assim, predominam CO, MP e SO₂ (dióxido de enxofre), durante os meses de inverno, quando as condições meteorológicas são mais desfavoráveis à dispersão dos poluentes, e o ozônio (O₃) apresenta maiores concentrações na primavera e verão, por ser um poluente secundário que depende da intensidade de luz solar para ser formado (CETESB, 2008).

No Estado de São Paulo, desde 1972, a CETESB (Companhia Ambiental do Estado de São Paulo) monitora e divulga diariamente os dados de qualidade do ar gerados pela sua rede de monitoramento. Os poluentes universalmente utilizados como indicadores da qualidade do ar são: CO, SO₂, MP, O₃ e NO_x.

1.3.1.1. Material Particulado Fino (MP_{2,5})

Tem diâmetro aerodinâmico menor que 2,5 µm, são as partículas que penetram mais profundamente no trato respiratório; as menores que 0,5 µm podem se depositar nos alvéolos pulmonares, enquanto as maiores ficam retidas na parte superior do sistema respiratório. Geralmente são emitidas em processos de combustão e exaustão de veículos automotores, mas também se formam na atmosfera a partir de reações químicas de gases como SO₂, NO_x e COV (compostos orgânicos voláteis) emitidos, principalmente, em atividades de queima de combustível. As partículas ultrafinas (< 0.1 µm) têm um tempo de residência relativamente pequeno na atmosfera, pois se agregam para formar partículas maiores (CETESB, 2008).

Diversos estudos realizados na RMSP desde 1987 mostram que a fração fina (MP_{2,5}) predomina o MP₁₀, correspondendo a cerca de 50-80% desse material, além

disso, observa-se significativa contribuição da emissão veicular na fração fina (37 %). O tamanho das partículas está indiretamente associado ao potencial causador de problemas à saúde, isto é, quanto menores em tamanho, maiores os danos provocados (WHO, 2005).

1.3.1.2. Dióxido de Nitrogênio (NO₂)

É um gás marrom avermelhado, com odor forte e muito irritante. Pode levar à formação de ácido nítrico, nitratos (o qual contribui para o aumento das partículas inaláveis na atmosfera) e compostos orgânicos tóxicos. As principais fontes são processos de combustão envolvendo veículos automotores, processos industriais, usinas térmicas que utilizam óleo ou gás, incinerações. Pode levar à formação de chuva ácida, danos à vegetação e à colheita (CETESB, 2008).

1.3.1.3. Ozônio (O₃)

É um gás incolor, inodoro e insípido. Não é emitido diretamente para a atmosfera. É produzido fotoquimicamente pela radiação solar sobre os óxidos de nitrogênio e compostos orgânicos voláteis. Causa danos às colheitas, à vegetação natural, plantações agrícolas; plantas ornamentais. (CETESB, 2008).

Poucos estudos foram realizados com seres humanos nesta região a respeito da interferência da poluição atmosférica na qualidade seminal

1.4. Toxicologia Reprodutiva

Como e quanto os fatores ambientais podem contribuir para infertilidade masculina é amplamente debatido nos dias de hoje. O ambiente é constituído de fatores físicos, biológicos, culturais, comportamentais e socioeconômicos constantemente interagindo com o organismo humano (Michal *et al*, 1993; Paradisi *et al*, 2009). A interação entre seres humanos e o ambiente é um processo contínuo e complexo, que leva o homem a se adaptar às diferentes condições do ambiente ao redor do mundo (Michal *et al*, 1993).

A poluição provê de fontes industriais e naturais; substâncias químicas são introduzidas no ambiente em quantidades de cada vez maiores, podendo interferir mais na saúde reprodutiva masculina. Contudo, é difícil avaliar este efeito, pois frequentemente mais de um tipo de substância está envolvida no processo (Michal *et al*, 1993; Olea *et al*, 2007).

A queima de combustíveis fósseis resulta na produção de misturas químicas complexas liberadas no ambiente (Yalk *et al*, 2008). Emissões de automóveis são a principal fonte de poluição atmosférica em áreas urbanas, sendo que a quantidade e o tipo de poluente pode variar dentro de uma mesma população (Kim *et al*, 2004). A concentração dos poluentes na atmosfera depende, basicamente, da quantidade dos poluentes emitidos pelas fontes e das condições meteorológicas.

Muitos contaminantes ambientais já foram associados a alterações em gametas femininos e masculinos, entre eles, metais pesados, substâncias químicas, pesticidas, xeno-hormônios (Sinawat, 2000).

1.4.1. Estudos Experimentais

Watanabe & Oonuki (1999) demonstraram que a exposição combustão de diesel estimula secreção hormonal, deprimido GnRH (Hormônio Regulador de Gonadotrofina) e inibindo a espermatogênese em ratos.

A poluição atmosférica pode, do mesmo modo, influenciar proporção sexual masculina. Em locais com elevadas concentrações de material particulado, foi relatado um declínio na proporção de nascidos do sexo masculino (Mocarelli, 1996; Lichtenfels *et al*, 2007). Outra evidência observada referente ao declínio da proporção de nascimentos masculinos na Europa aponta uma tendência a redução linear significativa de cerca de 10 machos para cada 100.000 nascimentos a cada ano (Martuzzi *et al*, 2001). Mohallem *et al* (2005) relataram um número menor de nascidos vivos por animal e maior incidência de falha de implantação no grupo de ratos expostos à câmara não filtrada, poluída com ar ambiente.

Rocha e Silva *et al* (2008) relataram que níveis ambientais de partículas e gases estão associados a uma redução significativa do peso fetal de camundongos expostos nas primeiras fases de gestação.

No estudo de Veras *et al* (2009) camundongos expostos a poluição ambiental manifestaram mudanças no ciclo de estral (estro) e redução significativa no número de folículos antrais ovarianos. Demonstraram também que a exposição materna antes que concepção afeta negativamente o peso fetal ao nascimento e o índice de perda pós-implantação.

Januário (2010) avaliou o efeito da exposição às partículas de exaustão do diesel no desenvolvimento, qualidade e potencial de implantação embrionária de camundongos. O estudo observou alteração nas taxas de formação, padrão de

eclosão, integridade morfológica e alteração na capacidade de adesão de blastocisto; prejuízo no crescimento do trofoblasto; prejuízo a integridade dos embriões, diminuição da taxa de células vivas e aumento a taxa de células em apoptose.

Também foram relatadas alterações morfológicas em ratos expostos à exaustão de diesel, tais quais: edema intersticial, degeneração dos túbulos seminíferos, descamação do epitélio e diminuição no número de espermatozóides (Yoshida *et al*, 1999).

Pires (2009) avaliou os efeitos de exposição ao MP_{2,5} no sistema reprodutor masculino em camundongos e encontrou alterações da densidade de células da linhagem germinativa, da frequência dos estádios do ciclo do epitélio seminífero e no número de células em apoptose nos estádios do ciclo espermatogênico.

1.4.2. Estudos Epidemiológicos

Com o advento da industrialização, diversos metais pesados e pesticidas, tais como o DDT (diclorodifeniltricloreto) (Keck *et al*, 1995; Sharpe, 1995; Jukes, 1995) e o dibromocloropropano (Yoshida *et al*, 1998), mostraram influenciar o sistema reprodutor masculino. Alguns estudos mostraram que a presença de produtos químicos tóxicos no ambiente pode ser responsável pelo declínio na contagem dos espermatozóides e assim reduzir a fertilidade (Metha & Kumar, 1997; Misra, 1998).

Esses efeitos foram observados quanto à exposição à poluição atmosférica e associação à redução na qualidade do ejaculado (Figa-Talamanca *et al*, 1996; Tielemans *et al*, 1999; Selevan *et al*, 2000; De Rosa *et al*, 2003; Rubes *et al*, 2003).

Exposição ocupacional a poluentes advindos do tráfego de veículos demonstrou reduzir a qualidade seminal (Figa-Talamanca *et al*, 1996; Tielemans *et al*, 1999). Viskum *et al*

(1999) sugeriu que exposição a chumbo reduz levemente a produção de espermatozóides, um efeito considerado parcialmente reversível.

Gouveia *et al* (2004) e Medeiros & Gouveia (2005) descreveram baixo peso ao nascer associado à exposição a poluição durante a gravidez.

Perin *et al* (2010) mostraram associação entre exposição a altos níveis de MP₁₀ ambiental durante o período pré-concepcional e perda prematura de gravidez em mulheres inférteis em tratamento de FIV – Fertilização *in vitro* que vivem em área metropolitana.

1.5. Avaliação da fertilidade

Na propedêutica do homem infértil, o histórico clínico e o exame físico minuciosos são recursos valiosos no início do processo investigativo. Um método não-invasivo para se avaliar a fertilidade masculina inclui análise seminal, dosagem de hormônios reprodutivos no sangue, e verificação de gravidez prévia (Oliva *et al*, 2001).

Experiências clínicas revelaram que não é exatamente o número absoluto de espermatozóides que dá o prognóstico de fertilidade, mas a sua capacidade funcional. Portanto, testes *in vitro* foram desenvolvidos para monitorar a capacidade funcional dessas células, avaliando seu potencial para movimento, penetração em muco cervical, capacitação, reconhecimento da zona pelúcida, reação acrossômica, fusão espermatozóide-ócito e formação do pró-núcleo. Além disso, foram desenvolvidos nos últimos anos diversos marcadores bioquímicos que fornecem informações sobre a eficiência da espermatogênese e a presença de estresse oxidativo (Huszar *et al*, 1990; Huszar & Vigue, 1994; Hallak, 1999).

1.5.1. Análise seminal

A análise seminal é uma forma de investigação destas causas, e é feita com uma amostra do ejaculado, que fornece um diagnóstico característico e rápido. (WHO, 1999). Uma análise seminal feita cuidadosamente reflete informações importantes sobre o ciclo hormonal masculino, espermatogênese e a permeabilidade do trato reprodutivo (McClure, 1998). A investigação da infertilidade compreende a análise de densidade, volume, cor, viscosidade, pH, concentração, motilidade e morfologia espermática (Jardim *et al*, 1999). A análise seminal permite uma avaliação direta da função reprodutiva masculina e a relação com exposição a agentes ambientais pode ser investigada (Oliva *et al*, 2001).

O processo de espermatogênese envolve uma série de passos complexos (replicação da célula, meiose, e espermiogênese) que duram aproximadamente 74 dias em seres humanos. O tempo de transporte até o epidídimo (estimado em 3–12 dias) e o intervalo de abstinência podem adicionar algumas semanas no tempo antes que o espermatozóide amadureça e seja ejaculado. Assim um período de exposição de aproximadamente 90 dias é geralmente aceito como suficiente para detectar efeitos em qualquer etapa da espermatogênese quando, o sêmen é utilizado como marcador biológico (Selevan *et al*, 2000)

Para avaliar potenciais exposições prejudiciais no local de trabalho, quantidade e qualidade seminais são freqüentemente usadas como um marcador da função reprodutiva masculina. À parte dos efeitos advindos da exposição ocupacional, efeitos de hábitos e estilo de vida, tais como cigarro e consumo de álcool devem ser levados em consideração (Wang *et al*, 2001).

Por razões de padronização e para que resultados obtidos em locais diferentes sejam comparáveis e confiáveis, os testes que envolvem sêmen devem ser realizados de acordo com diretrizes, como, por exemplo, as estabelecidas pela Organização Mundial de Saúde (WHO, 1999). É necessário enfatizar que a análise seminal não é um teste de fertilidade. A avaliação de fertilidade é um fenômeno complexo, multifatorial que envolve a avaliação do casal

1.5.2. Creatina Quinase

A enzima Creatina Quinase (CK) foi caracterizada como indicadora da qualidade do sêmen e da imaturidade celular (Huszar *et al*, 1988; Huszar *et al*, 1992a; Huszar *et al*, 1994; Huszar *et al*, 1997; Rolf *et al*, 1998; Dandekar & Parkar, 1999; Hallak *et al*, 2001; Huszar *et al*, 2001; Check *et al*, 2002;). Células que requerem muita energia como os gametas masculinos, são caracterizadas por uma alta atividade de CK (Rolf *et al*, 1998), que é considerada a enzima chave na geração, transporte e uso de energia. No espermatozóide, a CK funciona como combustível para motilidade (Huszar *et al*, 1988; Huszar & Vigue, 1993; Hallak *et al*, 1998), pois facilita a manutenção dos níveis intracelulares de ATP (adenosina trifosfato), que por sua vez, fornece energia para a interação dineína-tubulina que converte a energia química do ATP em movimentos mecânicos de batimento flagelar. (Hallak, 1999).

Esta enzima está inversamente correlacionada ao grau de maturação dos espermatozoides. O motivo pelo qual isto ocorre está na fase III da espermatogênese, mais especificamente na espermiogênese, onde ocorre a diferenciação celular, incluindo a condensação e a remodelagem estrutural do núcleo celular, a formação

do flagelo e a formação da região acrossômica, capacitação da membrana e a extrusão citoplasmática.

Neste último evento, ocorre a formação do “corpo residual” ou inclusão citoplasmática que posteriormente é fagocitado pelas células de Sertoli. Qualquer excesso citoplasmático que não for fagocitado fica ligado ao espermatozóide na região da peça intermediária, envolvendo as mitocôndrias. Pelas normas da OMS, se essa massa excessiva for maior que um terço da cabeça do espermatozóide, ela é classificada como “gota de inclusão citoplasmática”. (WHO, 1999)

Durante a extrusão, grande parte da CK presente no espermatozóide é eliminada, por isso encontra-se a CK em níveis baixos nos espermatozoides maduros. Nesses espermatozoides, o subtipo em maior concentração é CK-M, pois durante a fase de maturação o subtipo CK-B pára de ser produzido para que o CK-M passe a ser. Huszar *et al* (1992b) em um de seus estudos sobre CK, fez uma analogia para explicar tal fato: “Em tecidos contráteis, como os músculos, somente o subtipo B da CK está presente durante o desenvolvimento de animais. Entretanto, após o nascimento, quando os músculos são exercitados ou com o início da atividade contrátil, um subtipo mais específico M das isoformas de CK também é sintetizado, indicando que houve uma mudança na diferenciação celular (maturação)”.

Do ponto de vista funcional, espermatozoides imaturos, com CK aumentada e citoplasma residual, não conseguem se ligar ao oócito humano (Huszar *et al*; 1998).

1.5.3. Radicais Livres de Oxigênio

Radica Livres de Oxigênio (ROS) podem ser definidas como qualquer molécula que possua um ou mais elétrons não pareados na sua última camada. As

principais moléculas que apresentam maior reatividade são: radical hidroxila (OH[•]), ânion superóxido (O^{•-}), e o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (Agarwal *et al*, 1994).

Produzidas em níveis fisiológicos, essas moléculas são extremamente importantes para os espermatozóides, pois dão início ao processo de capacitação e reação acrossômica. Entretanto, quando produzidos em quantidades excessivas, oxidantes, como o peróxido de hidrogênio, podem interromper a função dos espermatozóides causando dano peroxidativo à membrana plasmática e inclusive alterações no DNA () do espermatozóide (Aitken, 1999; Pasqualotto *et al*, 2001; Agarwal *et al*, 2001).

Foi descrito que espécies reativas de oxigênio podem estar aumentadas durante infecções urogenitais associadas a leucocitospermia (Weidner *et al*, 1999).

Peróxido de hidrogênio, radicais livres de oxigênio e reativos intermediários de nitrogênio são altamente tóxicos ao espermatozóide. Eles são mediadores de dano celular em consequência da sua capacidade de modificar moléculas biologicamente importantes. Além dos danos já mencionados, os radicais livres podem conduzir a dano oxidativo ao DNA (*Deoxyribonucleic acid*) com alta incidência de quebra do mesmo. O grau de dano ao espermatozóide depende do local, o tempo de exposição a estes produtos e a habilidade das células espermáticas em ativar seu sistema de defesa anti-lipoperoxidativo intrínseco (Keck *et al*, 1998).

Espermatozóides têm um sistema de reparo de estruturas limitado, como consequência do pequeno e inativo citoplasma e da cromatina altamente condensada. Também são equipados com um sistema de defesa pouco eficiente contra ROS, uma vez que a catalase está completamente ausente e a glutathione peroxidase e o

superóxido dismutase estão presentes em quantidades relativamente baixas (Dohle, 2003).

1.5.4. Anticorpos Anti-espermatozóides

O testículo possui um privilégio imune que permite que os espermatozóides se desenvolvam isolados de antígenos que em condições normais, permanecem isolados pela barreira de hemato-testicular. Anticorpos anti-espermatozóides são formados no momento em esta barreira é rompida (Esteves *et al*, 2007; Marconi *et al*, 2008). Primeiro, serão produzidos anticorpos do tipo IgM, mas estes não são segregados na área genital porque são muito grandes para passar a barreira epitelial. Segundo, anticorpos do tipo IgG aparecem, e estes podem entrar na área genital. Os anticorpos anti-espermatozóide do tipo IgG entram em contato com o espermatozóide, e se prendem a estes (Comhair *et al*, 1999).

A primeira evidência de anticorpos anti-espermatozóides foi relatada por Rümke & Hellinger (Rümke & Hellinger, 1950¹ apud Evans *et al*, 1998). Clinicamente, anticorpos anti-espermatozóides estão presentes em 3-12% dos homens em avaliação de fertilidade e podem ser encontrados no soro, plasma seminal ou ligados ao espermatozóide (Esteves *et al*, 2007). A presença de anticorpos anti-espermatozóides no trato reprodutivo masculino afeta a função espermática, causando queda na motilidade e capacidade de fertilização, reação acrossômica prematura e aglutinação de espermatozóides, assim como diminuição da integridade da membrana e opsonização de espermatozóides por fagocitose. Os anticorpos anti-espermatozóides podem se ligar à superfície do espermatozóide no testículo ou

¹ Rümke P, Hellinger G. Auto-antibodies against spermatozoa in sterile men. *Am J Clin Pathol* 1959;32:357– 8.

epidídimo (antes da ejaculação) ou durante a união dos espermatozóides com o plasma seminal na ejaculação (Evans *et al*, 1998; Zavos *et al*, 1998; Esteves *et al*, 2007). O resultado é infertilidade imuno-relacionada.

2. OBJETIVO

Avaliar a influência dos níveis atuais de poluição atmosférica de origem veicular nos parâmetros seminais de controladores de tráfego expostos ocupacionalmente à fumaça da queima de combustíveis, na Região Metropolitana de São Paulo.

3. CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1. CARACTERÍSTICAS DO ESTUDO

3.1.1. Local do estudo

As avaliações clínicas foram realizadas no Ambulatório da Urologia – Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, as análises seminais realizadas no Laboratório de Poluição Atmosférica Experimental – Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e as análises hormonais realizadas pelo Laboratório Central – Setor de Hormônios (HC), no período de junho de 2007 a fevereiro de 2009. Este estudo teve aprovação pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) sob Protocolo de Pesquisa número 279/06.

3.1.2. Cálculo amostral inicial

Foram considerados os seguintes parâmetros:

- a) Tipo de estudo (não-pareado)
- b) Proporção de expostos entre os casos (10%)
- c) Odds Ratio (2)
- d) Número de controles para cada caso (0,5)
- e) Nível de significância (5%)
- f) Poder do teste (80%)
- g) Teste de hipótese (Bicaudal)

O tamanho amostral foi calculado com uma confiança de $100(1-\alpha)\%$

$$N = \frac{OR \times p(1-p)}{d^2}$$

onde:

N = tamanho da população

p = proporção esperada na população

OR = valor tabelado da distribuição normal

100(1-a)% = nível de confiança

d = semi-amplitude (precisão absoluta) do IC 100(1-a)%

IC = intervalo de confiança

Cálculo:

p = 10% (0,10)

IC 95%: a = 100-95 = 5% (0,05)

OR = 2

d = 5% (0,05)

então:

$$n = \frac{4 \times 0,1(1-0,1)}{0,0025} = 144 \text{ (amostra total, expostos + controle)}$$

3.1.3. Seleção dos pacientes

Foram avaliados dois grupos distintos: Grupo Exposto - Controladores de Tráfego expostos ocupacionalmente a poluição de origem veicular e Grupo Controle - População geral comprovadamente fértil, exposta a poluição ambiental. Os participantes incluídos no estudo concordaram com os termos do consentimento.

3.1.3.1. Grupo Exposto: Controladores de Tráfego expostos ocupacionalmente a altos níveis de poluição de origem veicular

Este grupo foi composto por sessenta e dois controladores de tráfego da Companhia de Engenharia de Tráfego do Estado de São Paulo (CET) que trabalham em ruas e avenidas com tráfego intenso de veículos na cidade de São Paulo. O grupo constava de homens com idade entre 27-46 anos e tempo médio de exposição de 7,3 ($\pm 4,0$) anos.

Inicialmente, funcionários do setor administrativo da CET (n=6) seriam vinculados ao grupo controle, porém, por já terem trabalhado previamente como controladores de tráfego, foram incluídos no grupo exposto à poluição para evitar um possível viés no grupo controle.

3.1.3.2. Grupo Controle: População geral comprovadamente fértil, exposta a poluição ambiental

Este grupo compreendeu duzentos e dez pacientes considerados férteis, do grupo pré-vasectomia do Ambulatório da Urologia (HC-FMUSP: Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo). Este grupo representa a população geral residente na RMSP, exposta a diferentes gradientes de poluição. O grupo constava de homens com idade entre 22-53 anos.

3.2. ANAMNESE E EXAME FÍSICO

Todos os participantes responderam um questionário, abrangendo histórico pessoal, familiar, sexual, epidemiológico e toxicológico – ANEXO A (este questionário é rotineiramente aplicado no Ambulatório de Infertilidade - Setor de

Urologia e já foi utilizado em pesquisas anteriores – Athayde, 2006). Os dados foram avaliados após a aplicação do questionário para possível inclusão do candidato (grupo controle). Após sanar dúvidas e ter a garantia de sua privacidade, foram encaminhados à avaliação física e coleta de sêmen.

O exame físico foi realizado nos colaboradores à temperatura ambiente com iluminação externa permitindo contraste suficiente para distinguir as varicosidades do plexo pampiniforme sob a pele (figura 2).

Figura 2: Varicocele

Para a medida do volume testicular: empregou-se o orquidômetro de Prader (Prader, 1966) que consiste num conjunto de 12 modelos de testículo, de forma elipsóide, feitos de plástico e montados em uma corda, com volumes de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 12, 15, 20 e 25 ml, além do paquímetro e para melhor avaliação do volume testicular (figura 3), de maneira mais objetiva, com auxílio de ultra-sonografia com Doppler escrotal

Figura 3: Instrumentos para mensuração do volume testicular. (A) Orquidômetro de Prader; (B) Paquímetro

3.3. ANÁLISE HORMONAL

Os níveis de FSH – Hormônio Folículo Estimulante (escala de referência: <10,5 IU/l), LH – Hormônio Luteinizante (escala de referência: 1,0-8,4 IU/l) e Testosterona Total (escala de referência: 271-965 ng/dl) foram determinados por ensaio imunofluorimétrico pelo sistema automatizado AutoDelfia utilizando Kits Wallac. O Estradiol (escala de referência: <35 pg/ml) foi determinado por ensaio fluorimétrico pelo sistema automatizado AutoDelfia utilizando Kits Wallac.

3.4. ANÁLISE SEMINAL

3.4.1. Coleta da amostra

As instruções sobre a coleta da amostra foram explicadas claramente e uma cópia foi entregue ao paciente, de acordo com as normas estabelecidas pela OMS - Organização Mundial de Saúde (WHO, 1999).

- a. As amostras foram coletadas com abstinência sexual de $4,9 \pm 7,8$ dias.
- b. O nome do paciente, o período de abstinência, a data e a hora da coleta, perda ou não de material durante a coleta e o intervalo entre a coleta e análise da amostra foram anotados.
- c. As amostras foram obtidas por masturbação e coletadas em um frasco adequado de plástico limpo e de “boca larga”. O recipiente não pode apresentar efeitos tóxicos sobre os espermatozóides.
- d. Os frascos foram identificados com o nome do paciente e número de identificação.

3.4.2. Análise Macroscópica

- a. Liquefação - O sêmen se liquefaz em 30-60 minutos em temperatura ambiente, embora isso normalmente ocorra em 15 minutos.
- b. Aparência/ Cor - A amostra seminal foi imediatamente analisada após liquefação. Uma amostra normal tem uma aparência homogênea e uma cor branca opalescente, podendo ser, eventualmente, amarela clara.
- c. Volume - O volume do ejaculado foi medido utilizando pipetas.
- d. Viscosidade - A viscosidade ou consistência da amostra liquefeita foi estimada por aspiração do sêmen em pipetas, seguido de fácil gotejamento. Dessa forma, a amostra foi classificada como normal quando gotas são formadas. No caso de viscosidade anormal verificou-se no processo de gotejamento a formação de um filamento maior do que 2,0 cm.
- e. pH - Uma vez liquefeita a amostra de sêmen, colocou-se uma alíquota sobre o papel de pH (faixa de pH 6,1 a 10) e observou-se, a cor obtida.

3.4.3. Análise Microscópica

Durante a investigação microscópica inicial da amostra, determinou-se concentração, motilidade e número de células redondas. Foi utilizado um microscópio de fase I para essas determinações no sêmen fresco.

3.4.3.1. Concentração espermática

A concentração espermática foi determinada através de câmaras da contagem Makler (Makler Counting Chamber – Mid Atlantic Diagnostics, Inc.). A câmara de Makler possui uma profundidade de 0,01mm e uma marcação graduada de 100 quadrados

(área total de 1 mm^2), cada um com $0,1 \text{ mm} \times 0,1 \text{ mm}$. Assim sendo, o volume compreendido na área de 10 quadrados é de $0,001 \text{ mm}^3$ ou milhão por ml (figura 4).

Figura 4: Câmara de contagem Makler e quadrado graduado em destaque

Tal fato facilita a leitura direta da concentração da amostra de sêmen (milhões por ml) pela simples contagem dos espermatozoides (spz) presentes na área de dez quadrados.

Colocou-se um volume de $5 \mu\text{l}$ de sêmen liquefeito no centro da câmara, adaptou-se a lamínula e foi realizada a contagem em microscopia de fase em aumento de 200 vezes. Foram contados espermatozoides móveis e imóveis em 3 fileiras não consecutivas. A concentração espermática foi determinada pela média desta contagem, expressa em milhões por ml.

3.4.3.2. Motilidade espermática

A motilidade é a determinação quantitativa e qualitativa do movimento dos espermatozoides. Foi realizada na câmara de contagem com microscopia de fase no aumento de 200 vezes. Uma alíquota de $5 \mu\text{l}$ de sêmen foi depositada na câmara, executando-se a contagem de 100 espermatozoides (em duplicata). Esta é dada pela

multiplicação do número de espermatozóides móveis por 100, dividido pela concentração; o resultado é expresso em porcentagem. A classificação quantitativa também segue os padrões da OMS, sendo que a somatória das porcentagens de espermatozóides grau a, b e c, deve ser igual a motilidade total. A motilidade progressiva é determinada pela soma dos graus a+b.

Grau a – espermatozóides móveis com progressão linear rápida;

Grau b – espermatozóides móveis com progressão linear lenta;

Grau c – espermatozóides móveis, porém sem progressão;

Grau d – espermatozóides imóveis.

3.4.3.3. Células redondas

O sêmen também apresenta outros elementos celulares sem ser os espermatozóides, são eles: espermátocitos, espermátides, leucócitos, eritrócitos, macrófagos, linfócitos, células epiteliais, bactérias, fungos, etc. O valor normal para células redondas é menor que $5 \times 10^6/\text{ml}$.

É importante diferenciar os leucócitos polimorfonucleares (LPMN) e as outras células de linhagem branca das células jovens da espermatogênese. A presença de mais de 1 milhão de LPMN por ml de sêmen ejaculado. Neste caso, realiza-se o teste para detecção de leucócitos.

3.4.3.4. Morfologia espermática

A morfologia é a segunda fase da análise microscópica e foi realizada através esfregaços corados com Diff Quick, Panótico (hemograma). Foram feitos esfregaços de 10

μl de sêmen fresco. Um mínimo de 200 espermatozóides foi estudado num aumento de 1000x de acordo com cada um dos critérios: OMS e Kruger.

Segundo o critério da OMS, um espermatozóide normal deve ter o comprimento dos segmentos cefálicos de 4-5 μm e a largura de 2,5-3,5 μm (figura 5 A) e não deve apresentar defeitos na peça intermediária, caudas ou gotas citoplasmáticas (WHO, 1999).

De acordo com a classificação do critério estrito de Kruger (Kruger *et al*, 1986), um espermatozóide é considerado normal quando seu segmento cefálico possui configuração oval, absolutamente perfeita, com um acrossomo bem definido, abrangendo cerca de 40-70% da porção cefálica do espermatozóide. Os segmentos cefálicos com formato limítrofe são consideradas anormais. O comprimento dos segmentos cefálicos normais para espermatozóides corados é de 5-6 μm e a largura de 2,5-3,5 μm. Não pode haver nenhuma anormalidade na peça intermediária ou na cauda. A peça intermediária deve ser delgada, anexada à parte central do corpo com menos de 1 μm de largura, enquanto seu comprimento deve ser de aproximadamente uma vez e meia o do segmento cefálico. A inclusão citoplasmática não poderá ser maior que a metade da porção cefálica, enquanto a cauda deve ser uniforme, ligeiramente mais fina que a peça intermediária, com aproximadamente 45 μm, e não poderá ser em espiral. A morfologia espermática considerada normal pelo critério estrito de Kruger é >14% (figura 5B).

Figura 5: Morfologia espermática. A – espermatozóide normal, critério OMS. B – espermatozóide normal, critério estrito de Kruger.

3.5. TESTE PARA DETECÇÃO DE LEUCÓCITOS

A solução de trabalho foi preparada a partir de uma solução estoque composta por Etanol 96%; Benzidina e água destilada. Adicionou-se 4,0 ml de solução estoque a 50 µl de H₂O₂ 3%, em frasco âmbar.

Colocou-se 20 µl de sêmen liquefeito em um tubo tipo eppendorf (âmbar), adicionou-se 20µl de HTF Modificado (Modified HTF medium hepes - Irvine Scientific) e 40 µl de solução de trabalho. Após 5 minutos, 5µl da solução foram depositados na câmara de Makler e observados sob lentes objetivas de 10x, sem fase.

Todos os leucócitos polimorfonucleados (LPMN) são corados em marrom escuro e mantêm o formato redondo.

Cálculo: $\frac{N \text{ leucócitos} \times 4}{10}$

3.6. ANTICORPO ANTI-ESPERMATOZÓIDE (IMMUNOBEADS)

Este teste quando positivo, indica causa imunológica como fator de infertilidade.

Foi separado o volume seminal equivalente a 10 milhões de espermatozóides móveis progressivos (a + b) por ml. Foram adicionados 3 ml de solução de albumina a 3% e

centrifugado por 10 min a 1600 rpm. Descartou-se o sobrenadante e o *pellet* restante ressuspendido em 100µl de solução de albumina a 5%. Em uma lâmina foram colocados 5 µl de “screen beads” (Immunobeads IgA, IgG e IgM – Irvine Scientific) e 5µl da amostra; que foram misturados com auxílio de uma ponteira e cobertos com lamínula. Em microscópio de fase II, em aumento de 400x, contou-se 100 espermatozóides móveis com “beads” aderidos ou não (figura 6). Valores $\geq 20\%$ de espermatozóides com “beads” aderidos foram considerados positivos (WHO, 1992).

Figura 6: “Beads” aderido a região do pescoço do espermatozóides

O quadro 1 contém os valores de referências para os parâmetros seminais segundo OMS.

Quadro 1: Valores de referência para características seminais

Parâmetro	OMS, 1999 (WHO, 1999)	OMS, 2009 (WHO, 2009)
Volume (ml)	$\geq 2,0$	1,5 (1,4-1,7)
Número total de spz (milhões)	≥ 40	39 (33-46)
Concentração (milhões/ml)	≥ 20	15 (12-16)
Motilidade total (a+b+c) (%)	* ≥ 50 (a+b) ou ≥ 25 (a)	40 (38-42)
Motilidade progressiva (a+b) (%)		32 (31-34)
Morfologia normal (%)	**	4 (3-4)
pH	$\geq 7,2$	$\geq 7,2$
Leucócitos peroxidase-positivos (milhões/ml)	$< 1,0$	$< 1,0$

* nesta edição não há separação de motilidade total e progressiva.

** nesta edição a OMS não estabelece valor de normalidade, porém reporta que em programas de reprodução assistida, formas normais abaixo de 15% indicam taxa de fertilização diminuída.

3.7. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA ENZIMA CREATINA-QUINASE

A CK é uma enzima que catalisa o processo de fosforização de ADP (adenosina difosfato) para ATP (adenosina trifosfato), e pode ser utilizada para a redução do NAD (nicotinamida adenina nucleotídeo) para NADH (nicotinamida adenina nucleotídeo desidrogenase). Os níveis de creatina quinase foram medidos utilizando-se o procedimento descrito inicialmente por Husgar, *et al* 1988. O procedimento envolve determinar a taxa de redução de NADH. As reações enzimáticas envolvidas são as seguintes:

3.7.1. Procedimento

Uma alíquota de sêmen de 250µl foi transferida para um tubo de poliestireno de 15ml. O plasma seminal foi removido através centrifugação a 2400 rpm, por 7 minutos com uma solução tamponada de imidazol gelada (0,15 M NaCl e 0,03 M Imidazol [Sigma, #I5513, São Paulo, Brasil] em pH 7,0) em uma relação de 1:15 (vol./vol.). O sobrenadante foi então descartado e o sedimento resultante (*pellet*) ressuspenso em solução de lise Triton X-100 a 0,1% (Sigma, #T8787, São Paulo, Brasil), misturando-a por 30 segundos. A amostra foi centrifugada novamente a 3400 rpm, por 10 minutos. O sobrenadante foi utilizado para estimar a atividade da CK, por meio da mensuração da alteração da absorbância da NADH a 340nm. Em uma cubeta de 4ml, foram depositados 20µl de sobrenadante e 1ml de solução de trabalho do kit espectrofotométrico para CK (CK-NAC Cinético, Bioclin, linha Crystal, São Paulo, Brasil). A solução foi homogeneizada invertendo-se a cubeta por 30 segundos. A mesma foi incubada em banho-maria a 37°C por 2 minutos. A absorbância (A), foi anotada a cada 30 segundos durante 4 minutos. A atividade da CK foi expressa em U/10⁸ espermatozoides.

3.7.2. Cálculos

$$\Delta A = \frac{A_{\text{final}} - A_{\text{inicial}}}{2}$$

$$\text{CK (U/100 milhões de espermatozoides)} = \frac{\Delta A/\text{minuto} \times V_T \times 100}{E \times LP \times V_A \times [C]}$$

$$\text{CK (U/100 milhões de espermatozoides)} = \frac{\Delta A/\text{minuto} \times 1,02 \times 100}{6,30 \times 1,0 \times 0,02 \times [C]}$$

$$\text{CK (U/100 milhões de espermatozoides)} = \frac{\Delta A/\text{minuto} \times 809,5}{[C]}$$

Onde:

$\Delta A/\text{minuto}$ = mudança na absorbância por minuto a 340 nm;

V_T = volume total, (1,02 ml);

E = delta de extinção molar do substrato em 340 nm, (6,30);

LP = "lightpath", caminho óptico (diâmetro da cubeta, 1,0 cm);

V_A = volume da amostra, (0,02ml);

100 = conversão para U/100 milhões de espermatozoides;

$[C]$ = concentração de espermatozoides (milhões/ml).

Valores de CK superiores a $0,36 \times 10^6$ U/10⁸ spz são considerados anormais (Athayde, 2006).

3.8. DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE RADICAIS LIVRES DE OXIGÊNIO

Para a determinação de ROS utiliza-se o Luminol. O luminol é um pobre quimioluminescente que reage com várias espécies reativas de oxigênio (H_2O_2 , $OH^\cdot$,

O⁻). Ele reage com estas espécies resultando na emissão de luz proporcional aos níveis de ROS presentes nas amostras seminais. Após a determinação dos parâmetros microscópicos do sêmen fresco, iniciou-se a mensuração de ROS, a qual foi determinada em sêmen puro (total).

3.8.1. Procedimento

A solução estoque de Luminol 100-mmol/l foi preparada através da dissolução de 100mg de pó Luminol (5-amino-2,3diidro-1,4 ftalazinediona, Sigma, catálogo # A8511, São Paulo, Brasil) em 5,64 ml de Dimetil Sulfóxido (DMSO, Sigma, catálogo # D5879, São Paulo, Brasil). A solução de trabalho do Luminol foi preparada misturando-se 380µl de DMSO com 20µl da solução estoque de Luminol, ou seja, diluindo o Luminol em 1:20 com DMSO.

Em um microtubo de 1,5ml (safe-lock eppendorf, catálogo # 0030120.086, São Paulo, Brasil), foram depositados 400µL da amostra seminal e 10µL da solução de trabalho do Luminol. A quimioluminescência foi medida por 15 minutos a 37°C. O luminômetro utilizado para as determinações foi o MicroBeta® Trilux (PerkinElmer life Sciences, Turku, Finlândia, software versão 4.7). Este equipamento recebeu um adaptador para leitura com microtubos do tipo eppendorf (24-well cassette #1450-102 com adaptadores #1450-108, São Paulo, Brasil).

3.8.2. Cálculos

$$\text{ROS (x } 10^4 \text{ cpm) / } 20 \times 10^6 \text{ espermatozóides} = \frac{\text{CPM} \times 20 \times 10^6}{[\text{C}]}$$

Onde:

CPM = do inglês *Counts Per Minute* (fótons contados por minuto);

20×10^6 = ajuste da concentração espermática;

[C] = concentração de espermatozóides (milhões/ml).

Valores de ROS superiores a $0,55 \times 10^4$ cpm são considerados anormais (Athayde *et al*, 2007).

3.9. DADOS DE POLUIÇÃO

Inicialmente, a análise da exposição dos funcionários da CET foi feita por meio de tubos passivos para NO_2 e O_3 , através de medidas individuais, em 2 períodos de 7 (sete) dias, calculando-se a média. Porém os participantes relataram uso incorreto dos tubos, somente no horário de trabalho (6 horas/dia), criando assim um viés no estudo. Além disso, estes tubos não puderam ser aplicados ao grupo controle, devido a dificuldade dos mesmos (pacientes SUS – Sistema Único de Saúde), em retornarem mais vezes ao hospital para troca dos tubos, além dos retornos para exames laboratoriais solicitados. Sendo assim, estes dados foram descartados e novo procedimento para mensurar a poluição foi realizado.

A análise de exposição à poluição foi realizada através da elaboração de mapas de isolinhas de concentração de elementos com auxílio do programa geoestatístico SURFER 8.0 onde as concentrações dos poluentes são interpoladas por krigagem ordinária*; para tal foram necessárias as coordenadas geográficas latitude e longitude em UTM (*Universal Transverse Mercator*) (obtidas no programa Google Earth.Ink) residencial de todos os pacientes do grupo pré-vasectomia e das principais

* Este método é o padrão recomendado quando não se têm informações específicas sobre os dados, pois gera bons resultados quando a variedade destes é grande. O método usa as tendências no mapa para extrapolar e gerar valores nas áreas sem dados, pode resultar em valores mínimos e máximos na grade além dos valores pré-estabelecidos. (Surfer 8 Self-Paced Training Guide, 2008)

ruas e avenidas na região onde os controladores trabalham (uma vez que há rodízio diário de ruas) e dados mensais dos poluentes coletados pela CETESB. Os poluentes analisados foram NO_2 , O_3 e $\text{MP}_{2.5}$. O nível de cada poluente foi determinado pela observação no mapa da localização de cada participante do estudo. A figura 7 ilustra o modelo dos mapas gerados no software.

Figura 7: Mapas gerados no software SURFER 8.0. A - mapa gerado pela extrapolação dos dados coletados pela CETESB. B - mapa com a localização geográfica dos pacientes e das estações da CETESB

O quadro 2 contém os valores de referências para os poluentes avaliados segundo a Cetesb (CETESB, 2008).

Quadro 2. Padrões de qualidade do ar:

Poluente	período	concentração ($\mu\text{m}/\text{m}^3$)
NO ₂	1 hora	320
	média anual	100
O ₃	1 hora	100
partículas totais em suspensão	24 horas	240
	média anual	80
partículas inaláveis	24 horas	150
	média anual	50

FONTE: Resolução CONAMA Nº 03 de 28/06/90

3.10. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A Análise Estatística foi realizada através do software SPSS versão 13.0 (Statistical Package for Social Sciences, Chicago, IL).

Foram utilizados os testes Kolmogorov-Smirnov (para verificar a normalidade das amostras), *Mann-Whitney* e *Teste T* em nível de significância de 5%. Correlação entre poluentes e parâmetros seminais foi realizada por Coeficiente de Correlação de Pearson. Análise Univariada de Variância foi realizada para verificar fatores de confusão. Análise de variância *One-Way* (ANOVA), seguido pelo teste de Tukey usado para quando fator de interferência foi identificado.

4. RESULTADOS

Durante o primeiro contato com a CET, solicitamos a participação de 150 (cento e cinquenta) funcionários na pesquisa. Porém após ciência dos resultados preliminares alarmantes, foi suspensa a participação dos mesmos, em caráter extra-oficial, mesmo após insistência e muitas reuniões.

Os participantes relataram o número de filhos, descrito na tabela 1.

Quanto ao hábito do tabagismo, quando questionados, 75% dos controladores de tráfego e 82,1% do grupo pré-vasectomia relataram não fazer uso do mesmo. 11,7% e 14,9% dos controladores e do grupo pré-vasectomia respectivamente relataram fazer uso do tabagismo. Também foram relatados ex-tabagistas em 13,3% dos controladores e 3,0% do grupo pré-vasectomia.

Os principais resultados obtidos no exame físico urológico, quanto à presença de varicocele (classificada através do maior grau) e volume testicular estão descritos na tabela 2.

Todos os participantes realizaram análise seminal Os resultados encontrados estão descritos na Tabela 3.

Tabela 1: Número de filhos relatado nos grupos

Controladores de tráfego			Pré-vasectomia	
Qtd de filhos	Frequência	%	Frequência	%
0	24	8,8	11	4,0
1	21	7,7	12	4,4
2	14	5,1	109	40,1
3	3	1,1	42	15,4
4	-	-	23	8,5
5	-	-	7	2,6
6	-	-	3	1,1
7	-	-	2	0,7
8	-	-	1	0,4

Tabela 2: Principais resultados obtidos na avaliação clínica urológica:

A – Varicocele

Grau de Varicocele	Controladores de tráfego	Pré - Vasectomia
ausente	64,5%	66,0%
Subclínica	19,4%	5,9%
Grau I	14,5%	23,2%
Grau II	0%	1,5%
Grau III	1,6%	3,4%

B1 - Volume testicular - Orquidômetro (ml)

	Controladores de tráfego	Pré-vasectomia	<i>p</i>
Esquerdo	21,4 (±5,3)	19,6 (±4,1)	0,005
Direito	22,6 (± 5,1)	20,1 (±3,9)	<0,001

B2- Volume testicular - Paquímetro (ml)

	Controladores de tráfego	Pré-vasectomia	<i>p</i>
Esquerdo	29,5 (±7,8)	21,1 (±5,9)	<0,001
Direito	30,5 (± 7,6)	22,7 (±6,3)	<0,001

Quanto ao teste para detecção de leucócitos, quando classificado pela positividade/negatividade, os controladores de tráfego apresentaram 79% das amostras negativas e 21% positivas. O grupo pré-vasectomia apresentou 92% amostras negativas e 8% negativas ($p=0,005$).

Foram realizados testes de função espermática e os resultados estão descritos na tabela 4.

Tabela 4: Testes de função espermática

	Anticorpo anti-espermatozóide (%)		CK (U/10⁸spz)		ROS (10⁴ cpm)	
	Média	DP	média	DP	média	DP
Controladores de tráfego	28,3	±10,75	0,157	±0,33	0,838	±2,71
Pré-Vasectomia	26,3	±13,29	0,491	±1,55	1,014	±3,41
<i>p</i>	0,382		<0,001		0,141	

Tabela 3: Média dos principais resultados da análise seminal nos grupos:

	Controladores de tráfego		Pré-vasectomia		
	média	DP	média	DP	<i>p</i>
Volume (ml)	3,2	±1,5	3,2	±1,7	0,797
Concentração (milhões/ml)	124,9	± 101,2	110,1	± 86,6	0,395
Nº total spz (milhões)	355,8	±295,8	231,3	±267,6	0,464
Motilidade total (%)	60	± 17,2	65	± 13,2	0,047
Motilidade progressiva (%)	27	±14,1	41	±15,9	<0,001
Grau a (%)	1	± 2,9	7	± 8,0	<0,001
Grau b (%)	26	± 12,5	33	± 11,8	<0,001
Grau c (%)	33	± 11,1	24	± 11,9	<0,001
Grau d (%)	40	± 17,2	35	± 13,0	0,044
Células redondas (milhões/ml)	11,45	± 16,0	8,3	± 8,9	0,282
Morfologia pelo critério estrito de Kruger (%)	3	± 2,5	6	± 4,2	<0,001
Morfologia pelo critério da OMS (%)	12	± 6,8	20	± 10,2	<0,001
Leucócitos peroxidase-positivos (milhões/ml)	0,57	± 1,5	0,53	± 2,4	0,202

A Tabela 5 mostra as médias encontradas nas análises hormonais entre os grupos.

Tabela 5: Resultados das análises hormonais (média $\pm$ DP)

	Controladores de tráfego	Pré-vasectomia	<i>p</i>
Estradiol (pg/ml)	28,8 $\pm$ 7,7	31,3 $\pm$ 7,4	0,119
FSH (IU/l)	3,8 $\pm$ 3,2	3,2 $\pm$ 1,7	0,140
LH (IU/l)	3,3 $\pm$ 1,8	3,1 $\pm$ 1,7	0,644
Testosterona Total (ng/dl)	440 $\pm$ 175,9	472 $\pm$ 169,3	0,365

A exposição média à poluição obtida no programa de dispersão SURFER 8.0 para Controladores de Tráfego e grupo pré-vasectomia está descrita na Tabela 6. Os mapas representando a dispersão de NO₂, O₃ e MP_{2,5} na RMSP para cada grupo estão nas figuras 8 e 9.

Tabela 6: Níveis de NO₂, O₃ e MP_{2,5} nos grupos

	Controladores de tráfego	Pré- vasectomia	<i>p</i>
NO ₂ (µg/ml)	39,4 $\pm$ 8,5	49,0 $\pm$ 11,9	<0,001
O ₃ (µg/ml)	35,7 $\pm$ 6,7	28,2 $\pm$ 8,3	<0,001
MP _{2,5} (µg/ml)	21,7 $\pm$ 5,3	24,6 $\pm$ 6,6	0,002

Foi realizado teste de correlação entre poluentes, parâmetros seminais, volume testicular e hormônios. Os dados estão descritos na tabela 7.

Figura 9: Mapas de dispersão de poluentes no grupo controle

Tabela 7: correlação entre poluentes, parâmetros seminais, volume testicular e hormônios.

	NO ₂		O ₃		MP _{2,5}	
	Correlação de	<i>p</i>	Correlação de	<i>p</i>	Correlação de	<i>p</i>
	Pearson		Pearson		Pearson	
Concentração (milhões/ml)	0,057	0,350	0,026	0,664	-0,035	0,566
Motilidade total (%)	0,024	0,688	-0,043	0,481	-0,015	0,806
Motilidade progressiva (%)	0,170	0,005	-0,187	0,002	0,023	0,703
Morfologia pelo critério estrito de Kruger (%)	0,086	0,156	-0,092	0,132	0,059	0,334
Morfologia pelo critério da OMS (%)	0,147	0,015	-0,088	0,147	0,067	0,271
ROS (10 ⁴ cpm)	-0,086	0,218	0,009	0,900	-0,007	0,923
Volume testicular esq. (paquímetro) (ml)	-0,314	0,000	0,323	0,000	-0,189	0,011
Volume testicular dir. (paquímetro) (ml)	-0,284	0,000	0,251	0,001	-0,187	0,012
Volume testicular esq. (orquidometro) (ml)	-0,105	0,095	0,203	0,001	-0,160	0,011
Volume testicular dir. ((orquidômetro) (ml)	-0,116	0,067	0,171	0,007	-0,164	0,009
Varicocele	0,096	0,120	0,003	0,963	-0,046	0,456
Estradiol (pg/ml)	-0,067	0,514	0,067	0,513	0,027	0,789
FSH (IU/l)	-0,043	0,673	0,015	0,880	-0,039	0,704
LH (IU/l)	-0,054	0,597	0,074	0,466	0,030	0,770
Testosterona Total (ng/dl)	0,012	0,908	0,008	0,939	-0,122	0,225

Foram considerados interferentes Idade e Tabagismo. A idade foi dividida em 4 subgrupos: I- 22 a 32 anos, II- 33 a 35 anos, III- 36 a 39 anos e IV- acima de 40 anos. A motilidade estava significativamente diminuída no grupo IV em relação aos outros grupos ($p>0,001$), em consequência, espermatozoides grau d estavam aumentados no grupo IV em relação aos demais grupos ($p>0,001$). O Tabagismo foi classificado como atual, passado ou ausente. O grupo passado apresentou morfologia pelo critério de Kruger ($p=0,023$) e morfologia pelo critério da OMS ($p=0,009$) diminuídas em relação ao grupo ausente; FSH apresentou-se maior no grupo atual em relação aos grupos ausente ($p=0,020$) e passado ($p=0,023$). Os dados estão descritos na tabela 8.

Tabela 8. Dados dos fatores de interferência, idade e tabagismo.

A – Análise da influência dos fatores nos parâmetros avaliados

	Idade	Tabagismo
Concentração (milhões/ml)	0,241	0,586
Motilidade (%)	0,006	0,820
Grau a (%)	0,672	0,227
Grau b (%)	0,744	0,623
Grau c (%)	0,534	0,575
Grau d (%)	0,009	0,804
Morfologia pelo critério de Kruger (%)	0,265	0,040
Morfologia pelo critério da OMS (%)	0,654	0,021
Anticorpo anti-espermatozóide (%)	0,656	0,721
CK (U/10 ⁸ spz)	0,858	0,574
ROS (10 ⁴ cpm)	0,943	0,635

Volume testicular E (paquímetro) (ml)	0,546	0,582
Volume testicular D (paquímetro) (ml)	0,495	0,844
Volume testicular E (orquidômetro) (ml)	0,389	0,995
Volume testicular D (orquidômetro) (ml)	0,782	0,593
Varicocele	0,428	0,736
Estradiol (pg/ml)	0,232	0,145
FSH (IU/l)	0,901	0,030
LH (IU/l)	0,180	0,096
Testosterona Total (ng/dl)	0,504	0,627

B- Parâmetros influenciados pela idade

	Subgrupo I (n)	Subgrupo II (n)	Subgrupo III (n)	Subgrupo IV (n)
Motilidade total (%)	67	68	64	57
Grau d (%)	33	32	36	43

C- Parâmetros influenciados pelo tabagismo

	Ausente (n)	atual (n)	passado (n)
Morfologia pelo critério de Kruger (%)	5	4	2
Morfologia pelo critério da OMS (%)	19	16	11
FSH (IU/l)	3	6	3

5. DISCUSSÃO

5.1. Volume testicular

O presente estudo revelou que o volume testicular, tanto mensurado pelo paquímetro, quanto pelo orquidômetro, se apresentou bilateralmente maior no grupo exposto ocupacionalmente à poluição atmosférica, provavelmente em decorrência de resposta inflamatória.

Na literatura, o estudo de Selevan *et al* (2000) não encontrou diferença no volume testicular de jovens residentes em uma cidade industrializada e em uma cidade rural com ar relativamente limpo, na República Tcheca.

Em estudos animais, a toxicidade testicular DBCP (dibromocloropropano), usados em agricultura, manifestou-se através de atrofia testicular (Torkelson *et al*, 1961² apud Multigner & Oliva, 2002). Pires (2009) encontrou alterações de peso corpóreo, de testículo e de epidídimo de camundongos expostos ao MP_{2,5}.

5.2. Hormônios

A qualidade seminal e parâmetros hormonais oferecem informações sobre função testicular e sobre o estado endocrinológico do eixo hipotálamo-pituitário-testicular. Em nosso estudo os níveis de Estradiol, LH, FSH e Testosterona total estavam dentro dos valores normais e foram similares em ambos os grupos.

O estudo Paradisi *et al* (2009) concorda com nossos resultados, nele os níveis séricos de LH, FSH, prolactina, testosterona total e livre em homens expostos à purificação total de ar não foram diferentes em relação a homens expostos à poluição

² Torkelson TR, Sadesk SE, Rowe VK, Kodama JK, Anderson HH, Loquvam GS, Hine CH. Toxicologic investigations of 1,2-dibromo-3-chloropropane. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1961;3:545-59

ambiental. Porém, Uhler *et al* (2003), demonstrou correlação negativa entre a atividade do FSH e concentração seminal em um grupo de homens sem fatores de riscos conhecidos para infertilidade.

5.3. Parâmetros seminais

Nossos resultados, com relação aos parâmetros seminais, estão de acordo com as descrições da literatura, pois o grupo exposto apresentou motilidades total e progressiva e morfologia pelos critérios estrito de Kruger e OMS significativamente menores que o grupo controle (comprovadamente fértil).

No estudo de De Rosa *et al* (2003) motilidades total e progressiva, viabilidade, permeabilidade de membrana, integridade do DNA e Teste de penetração em muco cervical bovino estavam reduzidos em atendentes de pedágio, continuamente expostos a poluentes ambientais em relação aos controles. Foram avaliadas as concentrações de CO, óxido de nitrogênio - NO, óxido de enxofre - SO e chumbo (Pb) em oito pedágios e em oito locais na área urbana onde participantes residiam. Os níveis sanguíneos de marcadores biológicos de poluição ambiental (metahemoglobina, sulfahemoglobina, carboxi-hemoglobina, Pb, protoporfirina de zinco) também foram avaliados.

Selevan *et al* (2000) avaliaram a qualidade seminal de indivíduos jovens residentes em área industrializada e em área rural e observaram que os primeiros apresentavam motilidade e morfologia reduzidas. Os dados de poluição foram fornecidos por I. Benes e R. Stevens do programa de monitoração de ar do Projeto

Teplíce (Srám *et al*, 1996³ apud Selevan *et al*, 2000). Estes dados incluíram MP₁₀ (coletado “amostrador versátil de poluição do ar” - VAPS), MP total, SO₂, CO, e NO_x.

Da mesma maneira relatou Wang *et al* (2001); em seu estudo a qualidade seminal (densidade, contagem total de espermatozóides e progressão linear) entre o grupo fumantes e expostos a compostos petroquímicos foi significativamente pior do que o grupo não-fumante e não-exposto. Hauser *et al* (2005), observou alteração na motilidade seminal em homens expostos a PCBs (Bifenilpoliclorado) e ftalatos.

Muitos estudos envolvendo subprodutos de combustão e substâncias tóxicas liberadas na atmosfera (como pesticidas), também encontraram redução na qualidade seminal. Mocarelli *et al* (2008) estudou que homens expostos a TCDD (produto secundário formado por combustão incompleta), e concluiu que a exposição durante a infância, reduz a concentração e motilidade espermática, e que exposição permanente leva a redução de estradiol e aumento de FSH. Ao estudar uma população infértil, Oliva *et al* (2001) observou que a exposição a pesticidas e solventes estava significativamente associada parâmetros seminais abaixo do limiar de fertilidade masculina. De Fleurian *et al* (2009) aplicou um questionário em homens com suspeita de infertilidade conjugal e relataram associações significativas entre declínio na qualidade seminal e fatores ocupacionais, tais como exposição a metais pesados, solventes, fuligem, e HC.

³ Srám RJ, Benes I, Binková B, Dejmek J, Horstman D, Kotěšovec F, Otto D, Perreault SD, Rubes J, Selevan SG, Skalík I, Stevens RK, Lewtas J. Teplíce program--the impact of air pollution on human health. Environ Health Perspect. 1996;104 Suppl 4:699-714.

5.4. Leucócitos

O teste para detecção de leucócitos peroxidase-positivos, apresentou-se dentro dos valores normais em ambos os grupos ($<1,0 \times 10^6/\text{ml}$), porém há controvérsias na literatura quanto a este valor de normalidade. Os valores limite para células peroxidase-positivas em homens férteis variam entre $0,5 \times 10^6$ e $1,0 \times 10^6$ LPMN por ml (Wolff, 1995). O manual da OMS adota $1,0 \times 10^6$ leucócitos por ml como o limiar para leucocitospermia, porém alguns autores acharam este valor muito baixo (Wolff, 1995), enquanto outros o consideram muito alto (Sharma *et al*, 2001; Punab *et al*, 2003; Athayde *et al*, 2007), dependendo do parâmetro avaliado (qualidade seminal, resultados de fertilização *in vitro*, presença de bactérias, espécies reativas de oxigênio).

Muitos estudos mostram correlação entre aumento de leucócitos e prejuízo seminal. Paradisi *et al* (2009) mostrou que a purificação total de ar não melhora os parâmetros seminais nem os hormônios reprodutivos, mas induz aumento nas concentrações de leucócitos (o que pode indicar ativação da imunovigilância num ambiente de ar purificado).

Aziz *et al* (2004), demonstrou correlação positiva entre leucocitospermia e defeitos na cauda do espermatozóide e dano ao acrossoma em homens saudáveis, doadores de sêmen. Yanushpolsky *et al* (1996) mostrou que altas concentrações de leucócitos pioram a qualidade seminal em pacientes inférteis. Da mesma maneira demonstrou Arata de Bellabarba *et al* (2000).

O papel dos leucócitos no sêmen ainda é pouco entendido. Leucocitospermia normalmente é associada à infecção no trato genital e/ou dano a qualidade do sêmen. Tipos diferentes de leucócitos possuem funções diferentes. Alguns subtipos de

leucócitos parecem ter efeitos protetores, por eliminação de espermatozóides amorfos, por fagocitose, e de detritos celulares. Porém, quando ativados, são capazes de segregar citocinas e outros fatores que podem afetar função do espermatozóide (Keck *et al*, 1998).

5.5. Anticorpo anti-espermatozóide

Em nosso estudo, ambos os grupos apresentaram valores de anticorpo anti-espermatozóide acima do limite aceitável (<20%). Na literatura existem apenas relatos da correlação entre anticorpos anti-espermatozóide e patologias que causam infertilidade masculina, não foram publicados casos de correlação com tóxicos ambientais.

Arap *et al* (2007) estudaram, entre outros parâmetros, os níveis de anticorpo anti-espermatozóides em homens com torção testicular e em homens comprovadamente férteis. Níveis de anticorpo anti-espermatozóides no grupo controle estavam normais (14,5%) e alterado nos grupos com torção testicular tratados por orquiectomia (21%) e orquidopexia (20%).

Knudson *et al* (1994) reportaram imunoglobulinas aderidas em 28% dos pacientes com varicocele (IgG-100%, IgA-86%) através do Teste Immunobeads. Djaladat *et al* (2006) também encontrou imunoglobulinas aderidas (aderência baixa 10-40%) em 26% de homens inférteis com varicocele e em somente 7% dos homens do grupo controle usando MarTest.

Vujisić *et al* (2005) estudaram 52 casais em tratamento de fertilidade e detectaram a presença de anticorpos IgG <20% em casais e >20% em 14 casais utilizando MarTest. Já no estudo de Esteves *et al* (2007), casais em tratamento de

fertilidade foram divididos de acordo com o número de anticorpos aderidos ao espermatozóide (Grupo I: 0%-10% Grupo II: 11%-20%; Grupo III: 21%-50% e Grupo IV: 51-100%) e não encontraram diferenças nas taxas de fertilização, gravidez e aborto entre os grupos.

5.6. Marcadores bioquímicos

5.6.1. Creatina Quinase

Os níveis de CK indicam maturidade espermática; em níveis altos são encontrados em espermatozóides imaturos, que retiveram gotas citoplasmáticas. Estudos sugerem que simultaneamente aos eventos de extrusão citoplasmática e mudanças nas isoformas da CK, ocorram mudanças nas organelas intracelulares, organização do material nuclear e uma remodelagem da membrana plasmática nos locais de reconhecimento molecular do oócito. (Huszar *et al*, 1997; Hallak, 1999). Do ponto de vista funcional, espermatozóides imaturos, com CK aumentada e citoplasma residual, não conseguem se ligar ao oócito humano (Huszar *et al*; 1998).

Em nosso estudo, os valores de CK apresentaram-se dentro do normal, porém maior no grupo controle. Da mesma maneira que os anticorpos anti-espermatozóide, na literatura existem apenas relatos de níveis de CK correlacionados a infertilidade masculina.

5.6.2. Radicais Livres de Oxigênio

Podem ser consideradas fontes de ROS: xenobióticos, poluição e espermatozóides anormais. ROS em altas concentrações podem ter efeitos tóxicos aos espermatozóides. Baixa concentração espermática pode ser atribuída à exposição

prolongada dos túbulos seminíferos a ROS produzidos por espermatozóides anormais. ROS está negativamente correlacionado a porcentagem normal de espermatozóides e motilidade. (Agarwal *et al*, 2003; Aziz *et al*, 2004; Athayde *et al*, 2007).

O grupo exposto à poluição apresentou altos níveis de ROS e número reduzido de espermatozóides morfológicamente normais, de acordo com relatos prévios da literatura (Agarwal *et al*, 2003; Aziz *et al*, 2004).

ROS pode ser gerado através dos seguintes mecanismos: radiação ionizante, radiação solar, bioativação de xenobióticos, células inflamatórias, aumento no metabolismo celular, distúrbios endógenos, deslocamento de metais de transição e perda da capacidade antioxidante. Alguns tóxicos químicos podem ser gerados durante a metabolização de drogas e químicos industriais através de uma oxidação peroxidativa ou pelo metabolismo do citocromo P₄₅₀. Estas espécies reativas podem induzir resposta inflamatória crônica (Parke & Sapota⁴, 1996, apud Ochsendorf, 1999).

A queima dos combustíveis automotores libera NO_x, que se constituem basicamente de NO, que se converte, total ou parcialmente, em NO₂ na atmosfera; este quando “quebrado” por fotólise, produz ozônio.

O O₃ é um importante oxidante da poluição fotoquímica. Como O₃ pode afetar negativamente a qualidade seminal ainda não foi esclarecido; ele pode induzir uma reação inflamatória na região genital masculina ou induzir a formação de espécies tóxicas circulantes, ambos os mecanismos podem levar a infiltração

⁴ Parke DV, Sapota A. Chemical toxicity and reactive oxygen species. *Int J Occup Med Environ Health*. 1996;9:331-40.

leucocitária, formação de ROS, fagocitose de espermatozóides e declínio da concentração espermática (Agarwal *et al*, 2006; Sokol *et al*, 2006).

5.7. Dados de poluição

Com relação ao dióxido de nitrogênio, em 2007 ocorreram ultrapassagens do padrão horário ($320 \mu\text{g}/\text{m}^3$) nas estações Cerqueira César e Ibirapuera. Nenhuma das estações registrou ultrapassagem do padrão anual de qualidade do ar. Em 2008, não foram registradas ultrapassagens dos padrões de qualidade do ar horário ($320 \mu\text{g}/\text{m}^3$) e anual ($100 \mu\text{g}/\text{m}^3$). (CETESB, 2007 e 2008)

Com relação ao ozônio, em 2007, houve maior ocorrência de eventos de altas concentrações na RMSP (padrão de 1 hora ($160 \mu\text{g}/\text{m}^3$) e o nível de atenção ($200 \mu\text{g}/\text{m}^3$), do que nos anos anteriores, sendo que muitos deles ocorreram, principalmente nos meses de setembro e outubro, num período de muitos dias secos e quentes. O ozônio ultrapassou o padrão em 72 dias, considerando todas as estações que medem este poluente, o que representa 20% dos dias do ano. Em 2008, houve menor ocorrência de eventos de altas concentrações na RMSP que nos anos anteriores; o ozônio ultrapassou o padrão em 49 dias, considerando-se todas as estações que medem este poluente, o que representa 13% dos dias do ano. (CETESB, 2007 e 2008)

A CETESB mensura somente níveis de MP_{10} ($\text{MP}_{2,5}$ representa 50-80% desta); este ultrapassou quatro vezes do padrão de curto prazo (média de $150 \mu\text{g}/\text{m}^3$ em 24 horas) em 2007, sendo duas em São Bernardo do Campo, onde ocorreram obras no entorno da estação, uma na estação Ibirapuera e outra na estação Taboão da Serra. Em 2008 as maiores concentrações foram registradas em Guarulhos, com duas

ultrapassagens do padrão de curto prazo (média de 150 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ em 24 horas), seguida das estações Parelheiros e Centro (CETESB, 2007 e 2008).

Não houve correlação direta da exposição a NO_2 , O_3 e $\text{MP}_{2,5}$ com parâmetros seminais em nosso estudo, mesmo estes poluentes tendo ultrapassado os padrões de qualidade aceitáveis nos anos estudados, segundo dados da CETESB. Na literatura, o estudo de Sokol *et al* (2006) encontrou uma relação inversa entre níveis de O_3 ambientais e concentração seminal em um grupo de doadores de sêmen. De Paula Santos *et al* (2005) também não encontrou relação entre PM_{10} e dióxido de nitrogênio (NO_2) com pressão arterial e eletrocardiograma em controladores de tráfego ocupacionalmente expostos a poluição veicular.

5.8. Fatores de interferência

5.8.1. Idade

Um declínio nos parâmetros seminais pode ter correlação com mudanças morfológicas que ocorrem com o avanço da idade, incluindo fibrose da membrana tubular, diminuição do tipo A de espermatogônias, enquanto espermatogônias atípicas e gigantes passam a ser mais frequentes. Somada a isso, descamação de células imaturas e um maior número de espermátides malformadas e gigantes é observado. Células de Sertoli apresentam maior contenção de lipídeos e aumento da vacuolinização (Haidl *et al*, 1996). Nelson & Bunge (1974) apresentaram a primeira evidência de declínio na contagem espermática e achados similares têm sido reportados.

Em nosso estudo, a motilidade espermática sofreu um declínio significativo no subgrupo acima de 40 anos em relação aos demais subgrupos, confirmando uma das tendências citadas acima.

Kidd *et al* (2001), em uma revisão da literatura de 1980 a 1999 sobre a influência da idade na análise seminal, sugeriram que com o avanço da idade está associado a um declínio no volume ejaculado, motilidade espermática e morfologia, porém não está relacionado com a concentração espermática. Mukhopadhyay *et al* (2010) em outra revisão, avaliaram a qualidade seminal e alterações idade-específicas em homens entre os anos 1980 e 2000. Um declínio significativo na motilidade espermática em ambas as décadas e no volume seminal na presente década foi demonstrado. No entanto, nenhuma alteração na concentração espermática foi observada.

Outros estudos recentes confirmam nossos resultados. Ivorra *et al* (2008) demonstraram que a idade está intimamente relacionada com diminuição do número de espermatozóides, diminuição do número de espermatozóides móveis e aumento de espermatozóides imóveis. Cardona Maya *et al* (2009) mostraram que o volume, motilidade progressiva, concentração e número total de espermatozóides eram inversamente proporcionais à idade em pacientes inférteis. Molina *et al* (2010) detectaram uma diminuição significativa no volume seminal, contagem de espermatozóides, motilidade, viabilidade e morfologia normal em relação à idade em pacientes de clínicas de fertilidade na Argentina.

5.8.2. Tabagismo

Diversos autores argumentam que o tabagismo está associado a variadas alterações nos parâmetros seminais, tais como redução do volume ejaculado, do número total de espermatozóides, da concentração, da motilidade e da morfologia. Nosso estudo mostrou que os indivíduos tabagistas atual e passado apresentaram um decréscimo significativo na porcentagem de formas normais pelo critério de Kruger e pela OMS em relação ao tabagismo ausente. Com relação ao hormônio FSH, todos os grupos apresentaram valores dentro da normalidade, porém nos grupos tabagismo atual e passado, o FSH apresentou-se maior em relação ao tabagismo ausente.

Kumosani *et al* (2008) investigaram a análise seminal de fumantes e não fumantes de uma clínica de infertilidade, que foram divididos entre férteis (com filho concebido nos últimos dois anos) e inférteis. Esses autores notaram que os fumantes exibiam uma motilidade significativamente menor, porém com uma concentração e morfologia similares aos não fumantes, tanto no grupo dos férteis quanto no dos inférteis. Além disso, Ramlau-Hansen *et al* (2007), em um estudo com mais de 2500 homens saudáveis, encontraram uma relação inversa e dose-dependente entre número de cigarros fumados por dia e o volume seminal, a contagem total de espermatozóides, a concentração e a motilidade espermática. Künzle *et al* (2003) também expuseram uma associação entre tabagismo e diminuição da concentração, contagem total, motilidade e morfologia normal.

Com relação aos níveis de FSH, no estudo de Ochedalski *et al* (1994) fumantes apresentaram níveis médios de LH, FSH e PRL menores do que os não-fumantes. No estudo de Halmenschlager *et al* (2009), fumantes e não fumantes apresentaram níveis médios similares de andrógenos, gonadotrofinas e SHBG.

5.9. Considerações finais

No ser humano, flutuações na contagem de espermatozóides, motilidade e morfologia são comuns. Contudo, estas flutuações são sutis, mantendo a fertilidade preservada. Os efeitos e influências do ambiente, como a exposição ocupacional a químicos, uso de álcool, drogas, medicamentos e anabolizantes esteróides tem maior importância clínica, pois estes fatores são capazes provocar efeitos supressivos na produção de espermatozóides e andrógenos pelos testículos, na libido e potência (Bartke, 1995).

Exposição ocupacional a produtos químicos no local de trabalho e seus efeitos nas funções testiculares e na fertilidade masculina têm sido foco de muitos estudos ao redor do mundo.

Nas últimas décadas, investigações sobre a exposição ocupacional forneceram evidências da associação entre exposição a certos tipos de químicos e desordens reprodutivas masculinas. As alterações relacionadas à exposição a desreguladores endócrino químicos incluem baixa qualidade seminal, baixa contagem de espermatozóides, baixo volume, alto número de espermatozóides morfologicamente anormais e baixa porcentagem de espermatozóides móveis (Olea *et al*, 2007).

O sistema reprodutivo masculino é particularmente vulnerável aos efeitos de substâncias químicas e do ambiente físico (Spira & Multigner, 1998). O declínio na quantidade e qualidade seminal refletem um fenômeno biológico, mais provavelmente causado por interferências ambientais do que causas genéticas (Paradisi *et al* 2009).

A avaliação da exposição ocupacional deve ser incorporada na rotina de exames de pacientes em investigação de infertilidade.

6. CONCLUSÃO

Apesar de inúmeros fatores agirem sobre a espermatogênese, podemos sugerir que talvez a poluição seja um dos determinantes para esse prejuízo nos parâmetros seminais motilidade e morfologia.

Conclui-se que a poluição veicular:

1. Tem influência negativa na motilidade e morfologia espermática
2. Causa elevação dos níveis de Radicais Livres de Oxigênio em todos os indivíduos expostos, particularmente, onde há exposição ocupacional e intensa. Portanto, há evidências de perda de função espermática com exposição à poluição de origem veicular.
3. Desencadeia reação antígeno-anticorpo em todos os indivíduos expostos, com elevação dos níveis de anticorpos anti-espermatozóides.
4. Causa um aumento do volume testicular, com possível mecanismo inflamatório. O mesmo fato foi achado em ratos expostos à poluição veicular.
5. Idade e Tabagismo são influencias negativas à motilidade espermática e morfologias OMS e Kruger e FSH respectivamente.
6. Não houve correlação entre os níveis dos gases mensurados e os dados negativos encontrados neste estudo, de forma geral; não houve correlação entre os níveis de dióxido de nitrogênio, ozônio e material particulado e os parâmetros de motilidade e morfologia e radicais livres de oxigênio de forma significativa entre os grupos. Deverá ser fruto de futura investigação o papel de metais pesados na gasolina e no diesel como fator desencadeante destes achados.

INFERTILIDADE MASCULINA - FICHA INICIAL DE ATENDIMENTO Data: ____/____/____

Nome: _____

Data Nasc: ____/____/____ Idade ____ anos

1- DADOS DEMOGRÁFICOS DO PACIENTERaça: a) **BR** b) **PT** c) **Parda** d) **AM** e) **IN** Raça da mãe (____) Raça do pai (____)

Escolaridade: a) 1º inc b) 1º comp c) 2º inc d) 2º comp e) 3º inc f) 3º comp g) pós-graduação

Profissão _____

Convênio **S N** Qual? _____

Religião: a) Católica b) Evangélica c) Espírita d) Outra Qual ? _____

Mãe: viva ☐ falecida ☐ Causa _____ Idade _____ Ascendência _____Pai: vivo ☐ falecido ☐ Causa _____ Idade _____ Ascendência _____Parentesco dos pais: **S N** Tipo: _____

Nº irmãos ____ Nº irmãs ____ abortos maternos ____ natimortos ____ óbitos perinatais ____

Irmãos falecidos ____ causa _____ irmãs falecidas ____ causa _____

Casamento anterior S N 1ª esposa Filhos: Masc ____ Fem ____

2ª esposa Filhos: Masc ____ Fem ____ 3ª esposa Filhos: Masc ____ Fem ____

2- DADOS DEMOGRÁFICOS DA PARCEIRA

Nome esposa: _____ Idade: ____ anos

Raça: a) **BR** b) **PT** c) **Parda** d) **AM** e) **IN** Raça da mãe (____) Raça do pai (____)

Escolaridade: a) 1º inc b) 1º comp c) 2º inc d) 2º comp e) 3º inc f) 3º comp g) pós-graduação

Profissão _____

Convênio **S N** Qual? _____

Religião: a) Católica b) Evangélica c) Espírita d) Outra Qual ? _____

Mãe: viva ☐ falecida ☐ Causa _____ Idade _____ Ascendência _____Pai: vivo ☐ falecido ☐ Causa _____ Idade _____ Ascendência _____Parentesco dos pais: **S N** Tipo: _____

Nº irmãos ____ Nº irmãs ____ abortos maternos ____ natimortos ____ óbitos perinatais ____

Irmãos falecidos ____ causa _____ irmãs falecidas ____ causa _____

Casamento anterior S N 1ª esposa Filhos: Masc ____ Fem ____

2ª esposa Filhos: Masc ____ Fem ____ 3ª esposa Filhos: Masc ____ Fem ____

3- ESTADO MATRIMONIAL DO PACIENTE

a) primeiro casamento b) divorciado c) divorciado e casado novamente

d) nunca casou e) amigado f) outro _____

4- DADOS DO CASALParentesco atual casamento: **S N** Tipo _____ Tempo de casamento ____ anos

Gestações ____ Nº de filhos vivos: Masc ____ Fem ____ Aborto provocado: _____

Aborto Espontâneo ____ Natimortos ____ Planejamento de gravidez ____ anos

Infertilidade 1) 1^{aria} 2) 2^{aria}

OBS: _____

5- ANTECEDENTES FAMILIAIS DO PACIENTE

Diabetes **S N** Doenças cardíacas **S N** Hipertensão **S N** Lupus **S N** Câncer **S N**
 Alcoolismo **S N** Suicídio **S N** Depressão **S N** Pais fumantes **S N** Abortos **S N**
 Retardo mental **S N** Defeitos físicos **S N** Anomalias mãos **S N** pés **S N**
 Problemas testiculares **S N** _____ penianos **S N** _____
 Problemas Urológicos _____
 Outros _____
 Casos de infertilidade **S N** _____

6- ANTECEDENTES FAMILIAIS DA PARCEIRA

Diabetes **S N** Doenças cardíacas **S N** Hipertensão **S N** Lupus **S N** Câncer **S N**
 Alcoolismo **S N** Suicídio **S N** Depressão **S N** Pais fumantes **S N** Abortos **S N**
 Retardo mental **S N** Defeitos físicos **S N** Anomalias mãos **S N** pés **S N**
 Problemas testiculares **S N** _____ penianos **S N** _____
 Problemas Urológicos _____
 Outros _____
 Casos de infertilidade **S N** _____

7- HÁBITOS DO PACIENTE

Café **S N** () expresso Qtd _____ xícaras/dia () coado Qtd _____ xícaras/dia
 Chá **S N** Tipo _____ Qtd _____ xícaras/dia
 Fumo **S N** () ativo () parou Tempo: _____ anos Qtd: _____ maços/dia
 Alcool { destilados **S N** () ativo () parou Tempo: _____ anos Qtd _____ copos/dia
 { fermentados **S N** () ativo () parou Tempo: _____ anos Qtd _____ copos/dia
 Drogas **S N** { tipo 1: _____ () ativo () parou Tempo: _____ anos Qtd: _____
 { tipo 2: _____ () ativo () parou Tempo: _____ anos Qtd: _____
 { tipo 3: _____ () ativo () parou Tempo: _____ anos Qtd: _____
 Medicamentos **S N** _____
 Faz uso de Suplemento Vitamínico: **S N** Qual? _____
 Uso de celular: _____ minutos/dia ou _____ horas/dia
 { Atividade física: **S N** Qual? _____
 { Qtd? _____ Tempo? _____
 { O que faz na horas de lazer (hobby)? _____
 { Qtd? _____ Tempo? _____
 Houve diminuição na habilidade de praticar esportes? **S N**
 Quantidade de água diária: () não bebe () menos de um litro () 1 a 2 litros () 2 ou mais litros

8- DADOS EPIDEMIOLÓGICOS AMBIENTAIS

Reside ou já residiu próximo a área industrial? **S N** Tempo: _____ anos
 Reside ou já residiu próximo a áreas de grande poluição? **S N** Tempo: _____ anos
 Reside ou já residiu próximo a áreas de tráfego intenso? **S N** Tempo: _____ anos
 Período de trabalho: () manhã () tarde () noite Horário: _____ às _____ horas
 Já trabalhou com/em:
 Indústria Química: **S N** Qual/qtt/tempo _____
 Laboratório **S N** Qual/qtt/tempo _____
 Máquinas copiadoras (xérox) **S N** Qual/qtt/tempo _____

9- ANTECEDENTES CLÍNICO-CIRÚRGICOS

Nascimento tempo de gestação: a) termo b) prematuro c) pós-termo
parto: a) normal b) cesárea c) fórcepe Peso _____ Altura _____

Infância: () Vômitos () Constipação () Bronquite () Pneumonias () Infecção respiratória () Sinusite () Rinite () Otite () Convulsões

Testículos migração: () fisiológica () induzida por medicamentos () criptorquidia **D E Bil**

Hérnia: () inguinal () umbilical () epigástrica () femoral () lombar **D E Bil**

Hidrocele **D E Bil** Varicocele **D E Bil** Torção de cordão espermático **D E Bil** idade _____

Cirurgias: () orquidopexia **D E Bil** () orquiectomia **D E Bil** () herniorrafia **D E Bil**
() varicocelectomia **D E Bil** () outras: _____

Pênis: () Hipospádia () epispádia () estenose uretra () pênis curvo congênito () micropênis

Cirurgia peniana: () correção de hipospádia () circuncisão () Uretra

Outras cirurgias do ap. genito-urinário _____

Cirurgia abdominal _____

Genitopatias (intersexo/malformações) _____

Caxumba: **S N** Idade _____ Orquite pós-caxumba: **S N Não sabe** Testículo afetado: **D E Bil**

Hepatite: **S N** Qual: **A B C D** Outra _____

Outras viroses: _____

DST **S N** Qual ? _____ Idade ____ anos *Chlamydia* **S N**

Tratamento _____

Exposição a radiação: **S N** Qual/qtt/tempo _____

Exposição ao calor: **S N** Qual/qtt/tempo _____

Exposição a metais pesados **S N** Qual/qtt/tempo _____

Trauma **S N** Qual/idade/conseqüências _____

Houve diminuição do tamanho dos testículos após alguma doença? **S N - Esq Dir Bil**

Lesão medular **S N** Nível _____

Fraqueza muscular **S N** Início ____ anos grupo muscular _____ progressiva **S N**

Infecções do Trato Urinário _____

Endocrinopatias _____

10- HISTÓRICO SEXUAL

1ª ejaculação _____ anos 1ª relação sexual _____ anos Nº de parceiras atuais _____

Desejo Sexual: () alto () moderado () baixo

Ejaculação: () normal () precoce () atrasado () dolorida () ausente () hemospermia

Ereção: Qualidade (nota de zero a 10) _____ Rigidez da ereção: () Completa () Incompleta

Manutenção da ereção até completar o ato sexual **S N** **Dor durante a relação: S N**

Frequência de relações/semana _____ Freq.relações no último mês _____

Tipo de relação: Vaginal: **S N** Sexo oral: **S N** durante a menstruação **S N**

Anal: **S N**, se Sim, usa preservativo (camisinha) **S N**

Lubrificantes: **S N** _____

Desejo Sexual (esposa): () alto () moderado () baixo **Dor durante a relação: S N**

Orgasmo: () nas preliminares (clitoridiano) () na penetração (vaginal) () não tem

Tipo de orgasmo: () tem somente a sensação orgástica () simples () múltiplo

Contracepção: Duração _____ anos Método: () Camisinha () Tabela () Pílula
() Diafragma () DIU () coito interrompido () Outro _____

11- EXAMES E TRATAMENTOS PRÉVIOS do PACIENTE

12- EXAMES E TRATAMENTOS PRÉVIOS da ESPOSA

13- ANAMNESE ATUAL DO PACIENTE

13A - CLÍNICA

Cefaléia **S N** Audição **S N** Olfato/Anosmia **S N** Coriza **S N** Sinusite **S N** Rinite **S N**

Alergias **S N** Hipertensão **S N** Anemia **S N** Diabetes **S N** _____

Doença crônica **S N** Qual? _____ Tratamento _____

Problemas Cardíacos **S N** _____ Tratamento _____

Outras doenças _____ Tratamento: _____

Insuficiência pancreática **S N** Fraqueza muscular **S N** idade de início _____ obs _____

Câncer **S N** Especificar _____

Radioterapia **S N** _____ Quimioterapia **S N** _____

Insônia **S N** Acorda cansado **S N** Tremores Musculares **S N** Cãimbras **S N** Labirintite **S N**

Gastrite **S N** Problemas hepáticos **S N** Osteoporose **S N** Hipotensão **S N**

Dores musculares **S N** Dores articulares **S N** Dim. Coordenação motora **S N** Parestesia **S N**

Inflamações Gengiva **S N** Dificuldade para mastigar/engolir **S N** Dermatites **S N**

Diminuição apetite **S N** Depressão **S N** Desconforto abdominal **S N** Irritabilidade **S N**

Hiperatividade **S N** Dificuldade raciocínio **S N** Dim. Memória **S N** Convulsões **S N**

Ganho ou Perda de peso de foram abrupta no último ano **S N**

Uso de medicamentos nos últimos 6 meses ? Especificar o tipo de medicamento e dosagem _____

Fatos relevantes de sua história: _____

13B - UROLÓGICA

Hidrocele **S N** Infecções **S N** DST **S N** _____ Dor testicular **S N**

Varicocele **S N** Orquite/epididimite **S N** Infecção urinária **S N** Probl Urinário/renal **S N**

14 - EXAME FÍSICO (a ser preenchido por médicos)
--

Cabeça a) nl b) microcefalia c) macrocefalia _____

Fácies: a) nl b) sindrômica _____ Freq. De barbear _____

Orelhas: a) nls b) implantação baixa c) em abano d) microtia e) apêndices pré-auriculares **D E**

Olhos: a) nl b) hiperterlorismo c) hipotelorismo d) fendas mongolóides e) anti-mongolóides

f) ptose g) lagofalmo h) alteração de visão **S N**

Nariz: a) nl b) em sela c) largo d) filtro longo Olfato: **Anosmia S N**

Boca: a) nl b) fissura labial c) fissura palatina d) microstomia **Dentes:** a) nl b) diástase de

incisivos **Maxila/mandíbula:** a) nl b) prognatismo c) retrognatismo d) micrognatia

Pescoço: a) nl b) curto c) alado d) limitação do movimento **Tireóide:** a) nl b) palpável

Tórax: a) nl b) em quilha **Coração:** a) à esq b) à dir **Pulso** _____ **PA** _____

MMSS a) nl D nl E b) cúbito valgo **Mãos:** a) nl D E b) polidactilia D E Tipo pré-axial pós-

axial c) curta D E d) alargamento de polegar D E Outra _____

Pés: a) nl D E b) anomalia (descrever) _____

Pele: a) nl b) vitiligo c) grossa d) psoríase e) hemangiomas planos f) hemangiomas cavernosos

g) manchas café-com-leite h) manchas hiper ou despigmentadas (descrever) _____

Neurológico: _____

15 – PROPORÇÕES		
Peso: _____ Kg	Altura: _____ m	IMC:
Envergadura:	PubePlanta:	
Relações:	Alt/enverg	Alt/pube planta

16 - ENDOCRINOLÓGICO							
Pilificação	Idade de início						
	Tanner	PI	PII	PIII	PIV	PV	PVI
Gordura	Distribuição						
Ginecomastia	a) ausente		b) presente à Dir			c) presente à Esq	

17 – NEUROLÓGICO			
sensibilidade perineal: a) presente b) diminuída	tônus do esfíncter anal: a) NI b) ☐		
Reflexo cutâneo-anal: a) + b) -	Reflexo bulbo cavernoso: a) + b) -	Reflexo cremastérico: a) + b) -	

18 – GENITÁLIA									
Pênis:	a) nl			b) micro		c) curvatura anômala		d) Placa fibrótica	e) Doença de Peyronie
	Tanner	GI	GII	GIII	GIV	GV			
Meato uretral	a) tópico			b) hipospádia *		c) epispádia		c) bífido	d) outro
				* b1) glandar	b2) peniana	b3) escrotal		b4) perineal	
Escroto	a) nl			b) transposição peno-escrotal					
Epidídimo Direito	a) nl			() Cabeça					
	b) área endurecida			() Corpo					
	c) cheio			() Cauda					
	d) vazio								
	e) petrificado								
Epidídimo Esquerdo	a) nl			() Cabeça					
	b) área endurecida			() Corpo					
	c) cheio			() Cauda					
	d) vazio								
	e) petrificado								
Testículo Direito	Tamanho			Localização				Consistência	
	Paquímetro			a) tópico				a) nl	
	_____ x _____ x _____			b) criptorquídico				b) petrificado	
	vol: _____ mL			c) inguinal				c) endurecido	
	Orquidômetro			d) abdominal				d) amolecido	
	vol: _____ mL			e) ectópico				e) mole	
Testículo Esquerdo	Tamanho			Localização				Consistência	
	Paquímetro			a) tópico				a) nl	
	_____ x _____ x _____			b) criptorquídico				b) petrificado	
	vol: _____ mL			c) inguinal				c) endurecido	
	Orquidômetro			d) abdominal				d) amolecido	
	vol: _____ mL			e) ectópico				e) mole	
Vasos Deferentes	Direito			a) presente				b) ausente	c) granuloma
	Esquerdo			a) presente				b) ausente	c) granuloma
Varicocele									
Direita	a) ausente			b) sub-clínica		c) GI		d) GII	e) GIII
Esquerda	a) ausente			b) sub-clínica		c) GI		d) GII	e) GIII
Doppler estetoscópio	cordão D Refluxo:			a) + () longo () curto				Tempo _____ seg	b) -
	cordão E Refluxo:			a) + () longo () curto				Tempo _____ seg	b) -
Próstata:									
Vesículas Seminais:	Hemospermia			S		N			

Referências Bibliográficas

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agarwal A, Ikemoto I, Loughlin KR. Effect of sperm washing on levels of reactive oxygen species in semen. *Arch Androl.* 1994; 33: 157-162, 1994.

Agarwal A, Kobayashi H, Gli-Guzman E, Mahran AM, Sharma RK, Nelson DR, Thomas Jr AJ - Quality control of reactive oxygen species measurement by luminal-dependent chemiluminescence assay. *J Androl.* 2001; 22: 568-574.

Agarwal A, Prabakaran S, Allamaneni S. What an Andrologist/Urologist should know about free radicals and why. *Urology.* 2006; 67: 2-8

Agarwal A, Saleh RA, Bedaiwy MA. Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. *Fertil Steril.* 2003; 79:829-843.

Aitken RJ. The human spermatozoon- a cell in crisis? *J Reprod Fertil.* 1999; 115:1-7

Akinaga LM, Lichtenfels AJ, Carvalho-Oliveira R, Caldini EG, Dolhnikoff M, Silva LF, Bueno HM, Pereira LA, Saldiva PH, Garcia ML. Effects of chronic exposure to air pollution from Sao Paulo city on coronary of Swiss mice, from birth to adulthood. *Toxicol Pathol.* 2009; 37(3):306-14

Arap MA, Vicentini FC, Cocuzza M, Hallak J, Athayde K, Lucon AM, Arap S, Srougi M. Late hormonal levels, semen parameters, and presence of antisperm antibodies in patients treated for testicular torsion. *J Androl.* 2007; 28:528-32.

Arata de Bellabarba G, Tortolero I, Villarroel V, Molina CZ, Bellabarba C, Velazquez E. Nonsperm cells in human semen and their relationship with semen parameters. *Arch Androl.* 2000; 45:131-6.

Arbex MA, de Souza Conceição GM, Cendon SP, Arbex FF, Lopes AC, Moysés EP, Santiago SL, Saldiva PH, Pereira LA, Braga AL Urban air pollution and chronic obstructive pulmonary disease-related emergency department visits. *J Epidemiol Community Health.* 2009; 63(10):777-83

Athayde KS, Cocuzza M, Agarwal A, Krajcir N, Lucon AM, Srougi M, Hallak J. Development of normal reference values for seminal reactive oxygen species and their correlation with leukocytes and semen parameters in a fertile population. *J Androl.* 2007; 28:613-20.

Athayde KS: *Padronização dos níveis de referência para normalidade dos marcadores bioquímicos de função espermática creatina quinase e radicais livres de oxigênio*. [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, 2006.

Auger J, Kunstmann JM, Czyglik F, Jouannet P. Decline in semen quality among fertile men in Paris during the past 20 years. *N Engl J Med*. 1995; 332:281-5.

Aziz N, Agarwal A, Lewis-Jones I, Sharma RK, Thomas AJ Jr. Novel associations between specific sperm morphological defects and leukocytospermia. *Fertil Steril*. 2004; 82:621-7.

Bartke A. Do environmental factors affect male reproductive functions? If so, which ones and how? Copyright © April 1995, by the American Society of Andrology , acessado em 03 de setembro de 2009

Braga AL, Saldiva PH, Pereira LA, Menezes JJ, Conceição GM, Lin CA, Zanobetti A, Schwartz J, Dockery DW. Health effects of air pollution exposure on children and adolescents in São Paulo, Brazil. *Pediatr Pulmonol*. 2001; 31: 106-113.

Braga ALF, Conceição GMS, Pereira LAA, Kishi H, Pereira JCR, Andrade MF, Gonçalves FLT, Saldiva PHN, Latorre MRDO. Air pollution and pediatric respiratory hospital admissions in Sao Paulo, Brazil. *J Environ Med*. 1999; 1: 95-102.

Braga ALF. *Quantificação dos efeitos da poluição do ar sobre a saúde da população pediátrica da Cidade de São Paulo e proposta de monitorização* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 1998.

Cardona Maya W, Berdugo J, Cadavid Jaramillo A. The effects of male age on semen parameters: analysis of 1364 men attending an andrology center. *Aging Male*. 2009;12:100-3.

Carlsen E, Giwercman A, Keiding N, Skakkebaek NE. Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years. *BMJ*. 1992; 305:609-13.

Check JH, Check ML, Katsoff D. Prognosis for Sperm Fertilizability: Analysis of Different Variables in Men. *Arch Androl*. 2002; 48: 73-83

Comhair FH, Mahmoud AMA, Depuyt CE, Zalata AA, Christophe AB. Mechanisms and effects of male genital tract infection on sperm quality and fertilizing potential: the andrologist's viewpoint. *Hum Reprod Update*, 5: 393-398, 1999

Dandekar SP & Parkar GM. Correlation Between Creatine Kinase Activity, Lipid – Peroxidation and Water Test in Male Infertility, *J Postgrad Med*. 1999; 45: 42-48

De Brito, JM. *Toxicidade cardiovascular e inflamatória aguda induzida pela inalação de partículas dos combustíveis diesel e biodiesel* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2010.

De Fleurian G, Perrin J, Ecochard R, Dantony E, Lanteaume A, Achard V, Grillo JM, Guichaoua MR, Botta A, Sari-Minodier I. Occupational exposures obtained by questionnaire in clinical practice and their association with semen quality. *J Androl*. 2009;30:566-79.

De Paula Santos U, Braga AL, Giorgi DM, Pereira LA, Grupi CJ, Lin CA, Bussacos MA, Zanetta DM, do Nascimento Saldiva PH, Filho MT. Effects of air pollution on blood pressure and heart rate variability: a panel study of vehicular traffic controllers in the city of São Paulo, Brazil. *Eur Heart J*. 2005; 26(2):193-200.

De Rosa M, Zarrilli S, Paesano L, Carbone U, Boggia B, Petretta M, Maisto A, Cimmino F, Puca G, Colao A, Lombardi G. Traffic pollutants affect fertility in men. *Hum Reprod*. 2003; 18: 1055-1061.

Djaladat H, Mehraei A, Rezazade M, Djaladat Y, Pourmand G. Varicocele and Antisperm Antibody: Fact or Fiction? *South Med J*. 2006; 99:44-47

Dohle GR. Inflammatory-associated obstructions of the male reproductive tract. *Andrologia*, 35: 321-324, 2003

Esteves SC, Schneider DT, Verza Jr S. Influence of Antisperm Antibodies in the Semen on Intracytoplasmic Sperm Injection Outcome. *Int Braz J Urol*. 2007; 33: 795-802.

Evans ML, Chan PJ, Patton WC, King A. A convenient mixed immunobeads screen for antisperm antibodies during routine semen analysis. *Fertil Steril*. 1998; 70:344-9.

Feki NC, Abid N, Rebai A, Sellami A, Ayed BB, Guermazi M, Bahloul A, Rebai T, Ammar LK. Semen quality decline among men in infertile relationships: experience over 12 years in the South of Tunisia. *J Androl*. 2009;30:541-7.

Figà-Talamanca I, Cini C, Varricchio GC, Dondero F, Gandini L, Lenzi A, Lombardo F, Angelucci L, Di Grezia R, Patacchioli FR. Effects of prolonged automobile driving on male reproduction function: a study among taxi drivers. *Am J Ind Med*. 1996; 30: 750-8.

Gouveia N, Bremner SA, Novaes HM. Association between ambient air pollution and birth weight in São Paulo, Brazil. *J Epidemiol Community Health*. 2004; 58:11-7.

Gouveia NC. *Air pollution and health effects in São Paulo, Brazil: a time series analysis* [tese]. Londres: Faculdade de Medicina da Universidade de Londres; 1997.

Gyllenberg J, Skakkebaek NE, Nielsen NC, Keiding N, Giwercman A. Secular and seasonal changes in semen quality among young Danish men: a statistical analysis of semen samples from 1927 donor candidates during 1977-1995. *Int J Androl*. 1999; 22:28-36.

Haidl G, Jung A, Schill, WB. Age and sperm function. *Hum Reprod*. 1996; 11: 558-60.

Hallak J, Sharma RK, Pasqualotto FF, Ranganathan P, Thomas Jr AJ, Agarwal A. Creatine Kinase as an indicator of sperm quality and maturity in men with oligospermia. *Urology*. 2001; 58:446-51

Hallak J, Sidhu RS, Sharma RK, Thomas Jr AJ, Agarwal A. Relationship Between Creatine Kinase Levels and Clinical Diagnosis of Infertility. *J Assist Reprod Genet*. 1998; 15: 188-192

Hallak J. *Creatina Quinase como um novo marcador de função espermática em sêmen fresco e criopreservado e a sua relação com infertilidade masculina*. [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, 1999.

Halmenschlager G, Rossetto S, Lara GM, Rhoden EL. Evaluation of the effects of cigarette smoking on testosterone levels in adult men. *J Sex Med*. 2009;6:1763-72.

Hauser R, Williams P, Altshul L, Calafat AM. Evidence of interaction between polychlorinated biphenyls and phthalates in relation to human sperm motility. *Environ Health Perspect.* 2005; 113(4):425-30.

Huszar G & Vigue L. - Incomplete Development of Human Spermatozoa is Associated with Increased Creatine Phosphokinase Concentration and Abnormal Head Morphology. *Mol Reprod Dev.* 1993; 34: 292-298

Huszar G & Vigue L. Correlation Between the Rate of Lipid Peroxidation and Cellular Maturity as Measured by Creatine Kinase Activity in Human Spermatozoa. *J Androl.* 1994; 15: 71-77

Huszar G, Kovanci E, Kovacs T, Moretti E, Vigue L, Bray-Ward P, Ward DC. FISH Assessment of Aneuploidy Frequencies in Mature and Immature Human Spermatozoa Classified by the Absence or Presence of Cytoplasmic Retention. *Human Reprod.* 2001; 16: 1209-1217

Huszar G, Patrizio P, Vigue L, Willets M, Wilker C, Adhoots D, Johnson L. Cytoplasmatic Extrusion and the Switch from Creatine Kinase B to M Isoform are Completed by the Commencement of Epididymal Transport in Human and Stallion Spermatozoa. *J Androl.* 1998; 19: 11-20

Huszar G, Sbracia M, Vigue L, Miller DJ, Shur BD. Sperm Plasma Membrane Remodeling During Spermiogenetic Maturation in Men: Relationship Among Plasma Membrane β 1,4-Galactosyltransferase, cytoplasmic creatine Phosphokinase, and Creatine Phosphokinase Isoform Ratios. *Biol Reprod.* 1997; 56: 1020-1024

Huszar G, Vigue C, Vigue L. Adenosine Triphosphate (ATP) Concentrations and ATP/ Adenosine diphosphate Ratios in Human Sperm of Normospermic, Oligospermic, and Asthenospermic Specimens and their Swin-up Fractions: Lack of Correlation Between ATP Parameters and Sperm Creatine Kinase Concentrations. *J Androl.* 1992a; 13: 305-311

Huszar G, Vigue L, Corrales M. Sperm Creatine Kinase Activity in Fertile and Infertile Oligospermic Men. *J Androl.* 1990; 11: 40-46

Huszar G, Vigue L, Corrales M. Sperm Creatine Phosphokinase Activity as a Measure of Sperm Quality in Normospermic, Variablespermic, and Oligospermic Men. *Biol Reprod.* 1988; 38: 1061-1066

Huszar G, Vigue L, Morshedi M. Sperm Creatine Phosphokinase M-Isoform Ratios and Fertilizing Potential of Men: a Blinded Study of 84 Couples Treated with In Vitro Fertilization. *Fertil Steril.* 1992b; 57:882-888

Huszar G, Vigue L, Oehninger S. Creatine Kinase Immunocytochemistry of Human Sperm-hemizona Complexes: Selective Binding of Sperm with Mature Creatine Kinase-Staining Pattern. *Fertil Steril.* 1994; 61: 136-142

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) (14 de agosto de 2009). Página visitada em 14 de agosto de 2009.)

Instituto Paulista de Ginecologia e Obstetrícia - IPGO. Infertilidade Masculina: O problema também pode ser deles. São Paulo (SP) Disponível em: <http://www.ipgo.com.br/asc/a_03.htm> Acesso em: 8 mar. 2005.

Ivorra JA, García VP, Gasset RM, García JS, Díaz AF, Zamora JA. Relationship between male age and semen quality. Experience at the number 14 health-care area of the Valencia health-care agency. *Arch Esp Urol.* 2008;61:705-10.

Januário, DANF. *Efeitos biológicos e avaliação dose-resposta das partículas de exaustão do diesel sobre o desenvolvimento embrionário inicial de camundongos* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2010.

Jardim CRF, Ros CTD, Lorenzini F. Fatores de risco. *In: I Consenso Brasileiro de Infertilidade Masculina*, São Paulo, pág. 14-15, 1999

Jukes T H. Effects of DDE. *Nature.* 1995; 376: 545.

Keck C, Bramkamp G, Behre HM, Müller C, Jockenhövel F, Nieschlag E. Lack of correlation between cadmium in seminal plasma and fertility status of non exposed individuals and two cadmium exposed patients. *Reprod Toxicol.* 1995; 9: 35-40.

Keck C, Gerber-Schäfer C, Clad A, Wilhelm C, Breckwoltd M. Seminal tract infections: impact on male fertility and treatment options. *Hum Reprod Update.* 1998; 4: 891-903.

Kidd SA, Eskenazi B, Wyrobek AJ. Effects of male age on semen quality and fertility: a review of the literature. *Fertil Steril*. 2001; 75(2): 237-48.

Kim JJ, Smorodinsky S, Lipsett M, Singer BC, Hodgson AT, Ostro B. Traffic-related air pollution near busy roads: the East Bay Children's Respiratory Health Study. *Am J Respir Crit Care Med*. 2004 ;170: 520-6.

Knudson G, Ross L, Stuhldreher D, et al. Prevalence of sperm-bound antibodies in infertile men with varicocele: The effect of varicocele ligation on antibody levels and semen response. *J Urol* 1994;151:1260–1262.

Kruger TF, Menkveld R, Stander FS, Lombard CJ, Van der Merwe JP, van Zyl JA, Smith K. Sperm morphologic features as a prognostic factor in in vitro fertilization. *Fertil Steril*. 1986;46:1118-23

Kumosani TA, Elshal MF, Al-Jonaid AA, Abduljabar HS. The influence of smoking on semen quality, seminal microelements and Ca^{2+} -ATPase activity among infertile and fertile men. *Clin Biochem*. 2008; 41:1199-1203.

Künzle R, Mueller MD, Hänggi W, Birkhäuser MH, Drescher H, Bersinger NA. Semen quality of male smokers and nonsmokers in infertile couples. *Fertil Steril*. 2003;79:287-91.

Liang XW, Lu WH, Chen ZW, Wang XH, Zhao H, Zhang GY, Gu YQ. Changes of semen parameters in Chinese fertile men in the past 25 years. *Zhonghua Nan Ke Xue*. 2008;14:775-8.

Lichtenfels AJ, Gomes JB, Pieri PC, El Khouri Miraglia SG, Hallak J, Saldiva PH. Increased levels of air pollution and a decrease in the human and mouse male-to-female ratio in São Paulo, Brazil. *Fertil Steril*. 2007;87:230-2.

Lin CA, Martins MA, Farhat SC, Pope CA 3rd, Conceição GM, Anastácio VM, Hatanaka M, Andrade WC, Hamaue WR, Böhm GM, Saldiva PH. Air pollution and respiratory illness of children in São Paulo, Brazil. *Paediatr Perinat Epidemiol*. 1999; 13: 475-87.

Lin CA, Pereira LA, Nishioka DC, Conceição GM, Braga AL, Saldiva PH. Air pollution and neonatal deaths in São Paulo, Brazil. *Braz J Med Biol Res.* 2004;37(5):765-70

Lopes FD, Pinto TS, Arantes-Costa FM, Moriya HT, Biselli PJ, Ferraz LF, Lichtenfels AJ, Saldiva PH, Mauad T, Martins MA. Exposure to ambient levels of particles emitted by traffic worsens emphysema in mice. *Environ Res.* 2009;109(5):544-51

Marconi M, Nowotny A, Pantke P, Diemer T, Weidner W. Antisperm antibodies detected by mixed agglutination reaction and immunobead test are not associated with chronic inflammation and infection of the seminal tract. *Andrologia.* 2008; 40, 227–234

Martuzzi M, Di Tanno ND, Bertollini R. Declining trends of male proportion at birth in Europe. *Arch Environ Health.* 2001; 56: 358-64.

Mauad T, Rivero DH, de Oliveira RC, Lichtenfels AJ, Guimarães ET, de Andre PA, Kasahara DI, Bueno HM, Saldiva PH. Chronic exposure to ambient levels of urban particles affects mouse lung development. *Am J Respir Crit Care Med.* 2008;178(7):721-8

Mazzoli-Rocha F, Magalhães CB, Malm O, Saldiva PH, Zin WA, Faffe DS. Comparative respiratory toxicity of particles produced by traffic and sugar cane burning. *Environ Res.* 2008;108(1):35-41

McClure, RD. Male Infertility *In:* Tanagho EA & Mcaninch JW. General Urology. 14^a ed. Lange Medical Book. cap 45, p. 745 e 749, 1998

Medeiros A & Gouveia N. Relationship between low birthweight and air pollution in the city of Sao Paulo, Brazil. *Rev Saude Publica.* 2005; 39:965-72.

Mehta RH & Kumar TCA. Declining semen quality in Bangaloreans: a preliminary report. *Curr Sci.* 1997; 72: 621- 622.

Michal F, Grigor K M, Negrovilar A, Skakkebaek NE. Impact of the environment on reproductive health: Executive Summary. *Environ Health Perspec.* 1993; 101(Suppl 2): 159-167.

Miraglia SGEK, Conceição GMS, Böhm GM. Analysis of urban air pollution on cardiovascular mortality in the elderly - a time series approach. In: International Symposium on Ecosystem Health, 2000, Brisbane. International Symposium on Ecosystem Health, 2000.

Misra M. Infertility on the rise in UP. In: Times of India. Lucknow, India: U. S. Gupta; 1998, p 1-23.

Mocarelli P, Brambilla P, Gerthous MP, Patterson Jr DG and Needham LI. Change in sex ratio with exposure to dioxin. *Lancet* . 1996; 348: 409.

Mocarelli P, Gerthoux MP, Patterson DG Jr, Milani S, Limonta G, Bertona M, Signorini S, Tramacere P, Colombo L, Crespi C, Brambilla P, Sarto C, Carreri V, Sampson EJ, Turner WE, Needham LL. Dioxin exposure, from infancy through puberty, produces endocrine disruption and affects human semen quality. *Environ Health Perspect*. 2008;116:70-7.

Mohallem SV, de Araújo Lobo DJ, Pesquero CR, Assunção JV, de Andre PA, Saldiva PH, Dolnikoff M. Decreased fertility in mice exposed to environmental air pollution in the city of Sao Paulo. *Environ Res*. 2005;98(2):196-202.

Molina RI, Martini AC, Tissera A, Olmedo J, Senestrari D, Fiol de Cuneo M, Ruiz RD. Semen quality and aging: analysis of 9.168 samples in Cordoba, Argentina. *Arch Esp Urol*. 2010; 63:214-222.

Monzo A, Kondylis F, Lynch D, Mayer J, Jones E, Nehchiri F, Morshedi M, Schuffner A, Muasher S, Gibbons W, Oehninger S. Outcome of intracytoplasmic sperm injection in azoospermic patients: stressing the liaison between the urologist and reproductive medicine specialist. *Urology*. 2001; 58:69-75.

Mukhopadhyay D, Varghese AC, Pal M, Banerjee SK, Bhattacharyya AK, Sharma RK, Agarwal A. Semen quality and age-specific changes: a study between two decades on 3,729 male partners of couples with normal sperm count and attending an andrology laboratory for infertility-related problems in an Indian city. *Fertil Steril*. 2010; 93:2247-54.

Multigner L & Oliva A. Secular variations in sperm quality: fact or science fiction? *Cad Saúde Pública*. 2002, 18:403-412

Nelson CM & Bunge RG. Semen analysis: evidence for changing parameters of male fertility potential. *Fertil Steril*. 1974. 25: 503-7.

Novaes P, Saldiva PH, Matsuda M, Macchione M, Rangel MP, Kara-José N, Berra A. The effects of chronic exposure to traffic derived air pollution on the ocular surface. *Environ Res*. 2010 May;110(4):372-4.

Ochedalski T, Lachowicz-Ochedalska A, Dec W, Czechowski B. Examining the effects of tobacco smoking on levels of certain hormones in serum of young men. *Ginekol Pol*. 1994;65:87-93.

Ochesendorf FR. Infections in the male genital tract and reactive oxygen species. *Hum Reprod Update*. 1999; 5:399-420.

Olea N, Fernandez MF. Chemicals in the environment and human male fertility. *Occup Environ Med*. 2007; 64:430-1.

Oliva A, Spira A, Multigner L. Contribution of environmental factors to the risk of male infertility. *Hum Reprod*. 2001;16:1768-76.

Palermo G, Joris H, Devroey P, Van Steirteghem AC. Pregnancies after intracytoplasmic injection of a single spermatozoon into an oocyte. *Lancet*. 1992; 340:17.

Paradisi R, Vanella S, Barzanti R, Cani C, Battaglia C, Seracchioli R, Venturoli S. Effects of indoor air purification by an air cleaning system (Koala technology) on semen parameters in male factor infertility: results of a pilot study. *Int J Androl*. 2009; 41:163-8.

Pasqualotto FF, Sharma RK, Nelson DR, Thomas Jr AJ, Agarwal A. Oxidative stress in normospermic men undergoing infertility evaluation. *J Androl*. 2001; 22:316-22

Paulsen CA, Berman NG, Wang C. Data from men in greater Seattle area reveals no downward trend in semen quality: further evidence that deterioration of semen quality is not geographically uniform. *Fertil Steril*. 1996; 65:1015-20.

Pereira LA, Loomis D, Conceição GM, Braga AL, Arcas RM, Kishi HS, Singer JM, Böhm GM, Saldiva PH. Association Between Air Pollution and Intrauterine Mortality in São Paulo, Brazil. *Environ Health Perspec*. 1998; 106:325-329.

Perin PM, Maluf M, Czeresnia CE, Januário DA, Saldiva PH. Impact of short-term preconceptional exposure to particulate air pollution on treatment outcome in couples undergoing in vitro fertilization and embryo transfer (IVF/ET). *J Assist Reprod Genet.* 2010 [in press]

Pires A. *Efeito da exposição ao material particulado (PM_{2,5}) da poluição atmosférica na espermatogênese de duas gerações de camundongos.* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 2009.

Pope III CA, Kanner RE. Acute effects of PM₁₀ pollution on pulmonary function of smokers with mild to moderate chronic obstructive pulmonary disease. *Am Rev Respir Dis.* 1993; 147:1336-40.

Prader A. Testicular size: Assessment and clinical importance. *Triangle.* 1966; 7:240-3.

Punab M, Lõivukene K, Kermes K, Mändar R. The limit of leucocytospermia from the microbiological viewpoint. *Andrologia.* 2003;35:271-8.

Ramlau-Hansen CH, Thulstrup AM, Aggerholm AS, Jensen MS, Toft G, Bonde JP. Is smoking a risk factor for decreased semen quality? A cross-sectional analysis. *Hum Reprod.* 2007; 22:188-196.

Relatório da Qualidade do Ar no Estado de São Paulo de 2007. *CETESB*, São Paulo, 2007. Disponível em <http://www.cetesb.br>.

Relatório da Qualidade do Ar no Estado de São Paulo de 2008. *CETESB*, São Paulo, 2008. Disponível em <http://www.cetesb.br>.

Rivero DH, Soares SR, Lorenzi-Filho G, Saiki M, Godleski JJ, Antonangelo L, Dolhnikoff M, Saldiva PH. Acute cardiopulmonary alterations induced by fine particulate matter of São Paulo, Brazil. *Toxicol Sci.* 2005;85(2):898-905.

Rocha E Silva IR, Lichtenfels AJ, Amador Pereira LA, Saldiva PH. Effects of ambient levels of air pollution generated by traffic on birth and placental weights in mice. *Fertil Steril.* 2008;90(5):1921-4.

Rolf C, Behre HM, Cooper TG, Koppers B, Nieschlag E. Creatine Kinase in Human Spermatozoa and Seminal Plasma Lacks Predictive Value for Male Fertility In Vitro Fertilization. *Fertil Steril*. 1998; 69: 727-734

Rubes J, Zudova Z, Vozdova M, Hajnova R, Urbanova J, Borkovec L, Novakova A. Air pollution and sperm quality. *Cas Lek Cesk*. 2000; 139:174-6.

Saldiva PH, Lichtenfels AJ, Paiva PS, Barone IA, Martins MA, Massad E, Pereira JC, Xavier VP, Singer JM, Böhm GM. Association between air pollution and mortality due to respiratory diseases in children in Sao Paulo, Brazil: a preliminary report. *Environ. Res.*, 1994; v. 65, p. 218-25.

Saldiva PHN, Pope III CA, Schwartz J, Dockery DW, Lichtenfels AJ, Salge JM, Barone I, Böhm GM. Air pollution and mortality in elderly people: a time-series study in Sao Paulo, Brazil. *Arch Environ Health*, 1995; 50:159-63.

Selevan SG, Borkovec L, Slott VL, Zudová Z, Rubes J, Evenson DP, Perreault SD. Semen Quality and Reproductive Health of Young Czech Men Exposed to Seasonal Air Pollution. *Environ Health Perspect*. 2000; 108:887–894.

Sharma RK, Pasqualotto AE, Nelson DR, Thomas AJ Jr, Agarwal A. Relationship between seminal white blood cell counts and oxidative stress in men treated at an infertility clinic. *J Androl*;22:575-83.

Sharpe RM. Reproductive biology. Another DDT Connection. *Nature* 1995; 375:538-539.

Shine R, Peek J, Birdsall M. Declining sperm quality in New Zealand over 20 years. *N Z Med J*. 2008; 121:50-6.

Sinawat S. The environmental impact on male fertility. *J Med Assoc Thai*. 2000; 83:880-5.

Sokol RZ, Kraft P, Fowler IM, Mamet R, Kim E, Berhane KT. Exposure to environmental ozone alters semen quality. *Environ Health Perspect*. 2006; 114:360-5.

Spira A & Multigner L. Environmental factors and male infertility: The effect of industrial and agricultural pollution on human spermatogenesis. *Hum Reprod.* 1998; 13:2041–2

Tielemans E, Van Kooij R, te Velde ER, *et al* Pesticide exposure and decreased fertilisation rates in vitro. *Lancet.* 1999; 354, p. 484 –485.

Uhler ML, Zinaman MJ, Brown CC, Clegg ED. Relationship between sperm characteristics and hormonal parameters in normal couples. *Fertil Steril.* 2003;79 Suppl 3:1535-42.

Veras MM, Damaceno-Rodrigues NR, Guimarães Silva RM, Scoriza JN, Saldiva PH, Caldini EG, Dolhnikoff M. Chronic exposure to fine particulate matter emitted by traffic affects reproductive and fetal outcomes in mice. *Environ Res.* 2009;109(5):536-43.

Viskum S, Rabjerg L, Jorgensen PJ, Grandjean P. Improvement in semen quality associated with decreasing occupational lead exposure. *Am J Ind Med.* 1999; 35:257-263.

Vujisić S, Lepej SZ, Jerković L, Emedi I, Sokolić B. Antisperm antibodies in semen, sera and follicular fluids of infertile patients: relation to reproductive outcome after in vitro fertilization. *Am J Reprod Immunol.* 2005;54(1):13-20.

Wang SL, Wang XR, Chia SE, Shen HM, Song L, Xing HX, Chen HY, Ong CN. A study on occupational exposure to petrochemicals and smoking on seminal quality. *J Androl.* 2001;22:73-8.

Watanabe N & Oonuki Y. Inhalation of diesel engine exhaust affects spermatogenesis in growing male rats. *Environ Health Perspect.* 1999; 107: 539-44.

Weidner W, Krause W, Ludwig M. Relavance of male accessory gland infection for subsequent fertility with special focus on prostatitis. *Hum Reprod Update.* 5: 421-432, 1999

Wolff H. The biologic significance of white blood cells in semen. *Fertil Steril.* 1995; 63:1143-1157.

World Health Organization. Laboratory manual for the examination of human semen and semen-cervical mucus interaction. 3rd ed. New York: Cambridge University Press, 1992:66–8.

World Health Organization: WHO air quality guidelines global update 2005. Report on a Working Group meeting, Bonn, Germany, 18-20 October 2005.

World Health Organization: WHO laboratory manual for the examination of human semen and sperm – cervical mucus interaction; 4th ed; Cambridge University Press. Cambridge, 1999.

World Health Organization: WHO laboratory manual for the Examination and processing of human semen. 5th ed; Cambridge University Press. Cambridge, 2009.

Yanushpolsky EH, Politch JA, Hill JA, Anderson DJ. Is leukocytospermia clinically relevant? *Fertil Steril*. 1996;66:822-5.

Yauk C, Polyzos A, Rowan-Carroll A, Somers CM, Godschalk RW, Van Schooten FJ, *et al* Germ-line mutations, DNA damage, and global hypermethylation in mice exposed to particulate air pollution in an urban/industrial location. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008; 105:605-10

Yoshida S, Sagai M, Oshio S, Umeda T, Ihara T, Sugamata M, Sugawara I, Takeda K. Exposure to diesel exhaust affects the male reproductive system of mice. *Int J Androl*. 1999;22:307-15

Yoshida S, Yamada H, Sugawara I, Takeda K. Effect of dibromochloropropane (DBCP) on the hormone receptors of the male rat reproductive system. *Biosci Biotechnol Biochem*, 1998; 62: 479-483.

Zavos PM, Correa JR, Zarmakoupis-Zavos PN. Antisperm antibody treatment mode: levels of antisperm antibodies after incubation with TEST-yolk buffer and filtration using the SpermPrep II method. *Fertil Steril*. 1998;69:517-21.

Zorn B, Virant-Klun I, Verdenik I, Meden-Vrtovec H. Semen quality changes among 2343 healthy Slovenian men included in an IVF-ET programme from 1983 to 1996. *Int J Androl*. 1999; 22:178-83.