Bruno Camargo Tiseo

**Avaliação da função hormonal reprodutiva, parâmetros
seminais e da fragmentação do DNA dos espermatozoides em
pacientes com lúpus eritematoso sistêmico**

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo
para obtenção de título de doutorado

Programa de Urologia

Orientador: Dr. Marcello Antonio
Signorelli Cocuzza

São Paulo

2018

Bruno Camargo Tiseo

**Avaliação da função hormonal reprodutiva, parâmetros
seminais e da fragmentação do DNA dos espermatozoides em
pacientes com lúpus eritematoso sistêmico**

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo
para obtenção de título de doutorado

Programa de Urologia

Orientador: Dr. Marcello Antonio
Signorelli Cocuzza

São Paulo

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Tiseo, Bruno Camargo

Avaliação da função hormonal reprodutiva,
parâmetros seminais e da fragmentação do DNA dos
espermatozoides em pacientes com lúpus eritematoso
sistêmico / Bruno Camargo Tiseo. -- São Paulo, 2018.

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

Programa de Urologia.

Orientador: Marcello Antonio Signorelli Cocuzza.

Descritores: 1.Lúpus eritematoso sistêmico
2.Espermatozoides 3.Fertilidade 4.Fragmentação do
DNA 5.Análise do sêmen 6.Infertilidade masculina

USP/FM/DBD-191/18

Responsável: Kátia Maria Bruno Ferreira - CRB-8/6008

Dedicatória

Aos Pacientes,

A razão primeira da medicina, suas
ciências, deste estudo e de minha
dedicação.

Aos meus pais, Dulceneia e Romualdo,

Meus modelos de empenho e dedicação.
Meu alicerce para crescimento em toda a minha vida.

Obrigado por todo o carinho com minha formação, por todo o estímulo que recebi desde sempre, por estarem sempre com disposição para me ajudar a alçar voos cada vez mais altos, por serem meus maiores professores na vida.

Acima de tudo, obrigado por doarem aos seus dois filhos, tempo, afeição, brandura e amor.

*"Um professor sempre afeta a eternidade. Ele nunca
saberá onde sua influência termina."*

Henry Brooks Adams (1838 -1918)

À minha esposa, Debora,

Minha companheira, por todo apoio e compreensão nas horas de frustração e de dificuldades. Pela ajuda nos cuidados com os filhos e pela sua dedicação a nossa família. Por ser tudo que eu sempre sonhei.

Aos meus filhos, Tomi e Beni,

Minhas maiores riquezas na vida, por mostrarem que, mesmo quando achamos que a vida é imensa, ela pode ser ainda maior. Por trazer a eternidade da nossa existência para a realidade.

Agradecimentos

AGRADECIMENTOS

- Ao meu avô, Antonio Tiseo, *mio nonno, in memorian*, pela sua perseverança, empenho e dedicação desde o momento que chegou em nosso país e durante a formação de sua família.
- À minha avó, Therezinha de Jesus Camargo, *in memorian*, pela sua atenção, carinho e cuidado próximo a seus familiares.
- À Clarissa Camargo Tiseo, minha irmã, que, por caminhos tortos, me ajudou na minha formação médica para me tornar um profissional mais atencioso com meus pacientes.
- À Giuseppa Manetta e ao Luiz Camargo Ribeiro, meus avós, pelos exemplos de dedicação e cuidado com a família.
- À família Kalman, pelo acolhimento sincero e fraternal que sempre recebi de todos. Por todo apoio e empolgação nas etapas do desenvolvimento de minha carreira.
- Ao Prof. Miguel Srougi, pelo profissionalismo que traz a Disciplina de Urologia, pelo seu modelo de conduta ética na atuação médica, pelo seu apoio e incentivo para meu período de *fellowship* no exterior.
- Ao Dr. Marcello Antonio Signorelli Cocuzza, orientador e tutor, pelo estímulo e apoio durante minha formação em Urologia. Pelo apoio e consideração durante a elaboração desta tese.
- Ao Prof. Dr. Clovis Artur Almeida da Silva, por todo apoio, estímulo, orientação e auxílio em todas as etapas desde a elaboração do projeto, durante seu desenvolvimento. Exemplo de espírito acadêmico e dedicação a pesquisa em nossa instituição.
- Ao Prof. Dr. Alberto Antunes, chefe da Pós-Graduação, pelo suporte e estímulo durante todo período da realização desta pesquisa. Exemplo

de competência liderando o crescimento da Pós-Graduação da Urologia.

- Ao Dr. Daniel Carvalho, pela amizade apoio durante a realização da tese e pelo modelo de conhecimento, ética e competência inclusive em sua defesa de tese de doutorado.
- Ao Dr. Samuel Gallafrio, pela grande amizade do irmão que ganhei durante a faculdade de medicina e pelo apoio integral em todos os momentos de minha carreira.
- Ao Dr. Marcos Machado, pela tutoria paternal em diversos aspectos de minha carreira e de minha vida pessoal, e pelo modelo de competência e indulgência aos pacientes e aos seus colegas.
- Aos Drs. Guilherme Wood e Davi Paluello, pela amizade, colaboração e estímulo constante durante todas as etapas da elaboração desta tese.
- À Dra. Gabriela Munhoz, por toda a ajuda que me deu durante a aquisição de dados para a pesquisa e pelo exemplo de força e superação dos desafios da vida.
- À Dra. Cygdem Tanrikut, pelo apoio e orientação durante meu *fellowship* no Departamento de Urologia do *Massachussets General Hospital of Harvard Medical School* em Boston, Estados Unidos da América.
- À Profa. Dra. Katia e ao Dr. Fabio Torricelli, pelas valiosas sugestões durante a qualificação desta tese para defesa de doutorado.
- À Camila Sommer e ao Henrique Fazão, pelo apoio e ajuda na realização das análises seminais e nos testes laboratoriais imprescindíveis para a elaboração desta tese.
- À Eunice Gaudino, pela ajuda com o contato com os pacientes para que as avaliações fossem devidamente programadas e agendadas.

- À Elisa da pós-graduação, pela ajuda integral durante a pós-graduação. Exemplo de competência e dedicação à Disciplina de Urologia.
- A todos os Professores, Residentes, Enfermeiros e Funcionários da Disciplina de Urologia do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo, pela amizade, respeito e suporte durante minha formação ética e profissional.

Epígrafe

“Toda nossa ciência, comparada com a realidade, é primitiva e infantil – mesmo assim é a coisa mais preciosa que temos.”

“All our science, measured against reality, is primitive and childlike - and yet it is” the most precious thing we have.”

Albert Einstein (1879-1955)

CONFLITO DE INTERESSE

Este projeto não apresenta nenhum conflito de interesse.

O desenvolvimento desta pesquisa ocorreu no Laboratório do Centro de Reprodução Humana do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (CRH HC-FMUSP) no Ambulatório de Urologia e no Ambulatório de LES da Disciplina de Reumatologia do HC-FMUSP, de outubro de 2016 a janeiro de 2018.

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

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

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

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

SUMÁRIO

Lista de figuras.....	xix
Lista de tabelas.	xx
Lista de abreviaturas.....	xxi
Resumo.....	xxiii
Summary.....	xxv
1. INTRODUÇÃO.....	01
1.1 Considerações sobre o lúpus eritematoso sistêmico	01
1.2 Considerações sobre a avaliação da fertilidade no homem.....	02
1.3 Considerações sobre a fragmentação do DNA espermático.....	03
1.4 Considerações sobre o uso da ciclofosfamida em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico e seu impacto na fertilidade masculina.....	08
1.5 Justificativa do projeto.....	08
2. OBJETIVOS.....	10
3. PACIENTES E MÉTODOS.....	11
3.1 Local do estudo.....	11
3.2 Desenho do estudo.....	12
3.3 Seleção dos pacientes.....	13
3.4 Cálculo da amostra.....	13
3.5 Critérios de exclusão.....	13
3.6 Critérios de avaliação dos indivíduos.....	14
3.6.1 Avaliação clínica e demográfica dos indivíduos.....	14
3.6.2 Avaliação clínica do lúpus eritematoso sistêmico.....	14
3.7 Exame físico.....	15
3.8 Análise hormonal.....	16
3.9 Análise seminal.....	17
3.9.1 Avaliação macroscópica.....	17
3.9.1.1 Volume.....	17
3.9.1.2 pH.....	17
3.9.2 Avaliação microscópica.....	17
3.9.2.1 Concentração espermática.....	17

3.9.2.2 Número total de espermatozoides.....	18
3.9.2.3 Motilidade espermática.....	18
3.9.2.4 Morfologia espermática.....	19
3.9.2.5 Teste de leucocitospermia (Endtz).....	20
3.10 Análise da fragmentação do DNA dos espermatozoides – <i>Alkaline</i> <i>COMET Assay</i>	20
3.11 Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE).....	24
3.12 Coleta dos dados.....	24
3.13 Análise estatística.....	24
4. RESULTADOS.....	26
4.1 Avaliação clínica e urológica.....	28
4.2 Avaliação hormonal.....	30
4.3 Avaliação da análise seminal.....	31
4.4 Avaliação da fragmentação do DNA do espermatozoide.....	32
4.5 Subanálises dentro do grupo LES.....	33
4.5.1 Avaliação clínica e urológica.....	33
4.5.2 Avaliação hormonal.....	35
4.5.3 Avaliação da análise seminal.....	36
4.5.4 Avaliação da fragmentação do DNA do espermatozoide.....	37
4.5.5 Avaliação da correlação entre escore de LES, doses cumulativas de medicações e o índice de fragmentação do DNA espermático.....	38
5. DISCUSSÃO.....	39
6. CONCLUSÕES.....	47
7. ANEXOS.....	48
8. REFERÊNCIAS.....	51

Lista de figuras

Figura 1. Desenho do estudo.....	12
Figura 2. Orquidômetro de Prader.....	16
Figura 3. Método de confecção da lâmina para avaliação da fragmentação do DNA do espermatozoide.....	22
Figura 4. Método para cobertura da lâmina com solução de lise para avaliação da fragmentação do DNA do espermatozoide.....	22
Figura 5. Método para eletroforese em meio alcalino para avaliação da fragmentação do DNA do espermatozoide pelo método COMET.....	23
Figura 6. Padrões de dispersão do DNA dos espermatozoides no teste cometa alcalino.....	23
Figura 7. Fluxograma dos indivíduos incluídos no projeto durante o processo de exclusões.....	27

Lista de tabelas

Tabela 1. Comparação dos dados demográficos entre os grupos.....	29
Tabela 2. Comparação da análise hormonal entre os grupos.....	30
Tabela 3. Comparação da análise seminal entre os grupos.....	31
Tabela 4. Comparação da análise da fragmentação do DNA espermático entre os grupos.....	32
Tabela 5. Comparação dos dados demográficos entre grupos de pacientes com LES separados pelo uso ou não de ciclofosfamida.....	34
Tabela 6. Comparação da análise hormonal entre grupos de pacientes com LES separados pelo uso ou não de ciclofosfamida.....	35
Tabela 7. Comparação da análise seminal entre grupos de pacientes com LES separados pelo uso ou não de ciclofosfamida.....	36
Tabela 8. Comparação da análise da fragmentação do DNA espermático entre grupos de pacientes com LES separados pelo uso ou não de ciclofosfamida.....	37
Tabela 9. Coeficientes de correlação entre variáveis e índice de fragmentação do DNA espermático.....	38

Lista de abreviaturas

ACR	Colégio americano de Reumatologia - traduzido do inglês: <i>American college of rheumatology</i>
CIC	Ciclofosfamida intravenosa
CRH HC-FMUSP	Centro de Reprodução Humana do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
DFI	Índice de fragmentação do DNA - traduzido do inglês: <i>DNA fragmentation Index</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico - traduzido do inglês: <i>Deoxyribonucleic acid</i>
DST	Doença sexualmente transmissível
FIV	Fertilização <i>in vitro</i>
FSH	Hormônio folículo estimulante - traduzido do inglês: Follicle-stimulating hormone
HC-FMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
HIV	Vírus da imunodeficiência humana adquirida - traduzido do inglês: <i>Human immunodeficiency virus</i>
ICSI	Injeção intracitoplasmática de espermatozoide - traduzido do inglês: <i>Intracytoplasmic sperm injection</i>
IIQ	Intervalo interquartil
IMC	Índice de massa corpórea
LES	Lúpus eritematoso sistêmico
LH	Hormônio luteinizante - traduzido do inglês: Luteinizing hormone
LMPA	Agarose de baixo ponto de fusão – traduzido do inglês: <i>low-melting point agarose</i>

OMS	Organização Mundial da Saúde
REDCap	Coleta eletrônica de dados para pesquisa - traduzido do inglês: <i>Research Electronic Data Capture</i>
RNA	Ácido Ribonucleico - traduzido do inglês: <i>Ribonucleic acid</i>
ROC	Característica de Operação do Receptor – traduzido do inglês: <i>receiver operating characteristic</i>
ROS	Radicais livres de oxigênio
SIDA	Síndrome de imunodeficiência adquirida
SCD	Dispersão da cromatina espermática - traduzido do inglês: <i>Sperm chromatin dispersion</i>
SCSA	Teste da estrutura da cromatina do espermatozoide – traduzido do inglês: <i>Sperm chromatin structure assay</i>
SHBG	Globulina ligadora de hormônios sexuais – traduzido do inglês: <i>sex steroid-binding globulin</i>
SLEDAI-2K	Índice de atividade de doença do Lúpus eritematoso sistêmico - traduzido do inglês: <i>Systemic lupus erythematosus disease activity index 2000</i>
SLICC	Clínicas colaboradoras para Lúpus sistêmico - traduzido do inglês: <i>Systemic lupus collaborating clinics</i>
SLICC-DI/ACR	Índice de dano das clinicas colaboradoras para lúpus sistêmico - traduzido do inglês: <i>Systemic lupus International collaborating clinics damage index / American college of rheumatology</i>
TBE	Solução tampão tris-borato-EDTA
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido

RESUMO

Tiseo BC. Avaliação da função hormonal reprodutiva, parâmetros seminais e da fragmentação do DNA dos espermatozoides em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2018.

Introdução: O lúpus eritematoso sistêmico (LES) é uma doença crônica autoimune com predomínio no sexo feminino e com evidente impacto em sua fertilidade. Por sua vez, em homens com LES foi observado alterações nos parâmetros seminais e nos níveis de hormônios sexuais. A análise seminal somente apresenta baixa correlação com potencial de fertilidade dos pacientes. Recentemente, a análise da integridade do DNA do espermatozoide tem mostrado melhor capacidade prognóstica para predizer a fertilidade do que os parâmetros seminais convencionais. **Objetivo:** Avaliar a fragmentação do DNA espermático de homens com LES sem azoospermia. **Métodos:** Vinte e oito pacientes homens, consecutivos, com LES (pelos critérios da ACR) e 34 controles foram avaliados conforme dados demográficos e de exposição ambiental, avaliação urológica, perfil hormonal e avaliação seminal (incluindo a fragmentação do DNA espermático). Aspectos clínicos, escores de atividade e dano cumulativo da doença e aspectos do tratamento também foram analisados. **Resultados:** Mediana da idade [33(20-52) vs. 36.5(25-54) anos, $p=0.329$] e frequência de varicocele (25% vs. 32%, $p=0.183$) foram similares entre o grupo de pacientes e o grupo controle. Na análise da fragmentação do DNA do espermatozoide observou-se quantidades significativamente mais altas de células classe III [44(9-88) vs. 16.5(0-80)%, $p=0.001$] e células classe IV [10.5(3-86) vs. 7(0-36)%, $p=0.039$] no grupo com LES. O índice de fragmentação do DNA espermático também foi significativamente mais alto em pacientes com LES [62(31-97) vs. 25.5(0-100)%, $p<0.001$]. Parâmetros seminais convencionais (incluindo contagem espermática, motilidade e morfologia) foram similares em ambos os grupos. Dentro de grupo de pacientes com LES não foi observada correlação entre o índice de fragmentação do DNA espermático com idade, duração da doença, SLEDAI-2K e SLICC/ACR-DI ou dose cumulativa de prednisona, hidroxicloroquina, metotrexato, azatioprina,

micofenolato mofetil ou ciclofosfamida intravenosa (CIC) ($p>0.05$). Análises adicionais evidenciaram que motilidade espermática total foi significativamente menor no grupo que fez uso de CIC [64%(15-83) vs. 72%(57-86)%, $p=0.024$]. O índice de fragmentação do DNA espermático foi semelhante nos dois grupos [52.5(31-95) vs. 67.5(34-97)%, $p=0.185$]. **Conclusões:** Homens com SLE sem azoospermia apresentam maior índice de fragmentação do DNA espermático sem alteração dos parâmetros seminais ou hormonal. CIC não parece ter papel significativo nesta alteração. Estudos prospectivos futuros são necessários para determinar o impacto desta alteração na fertilidade destes pacientes.

Descritores: Lúpus eritematoso sistêmico; Espermatozoides; Fertilidade; Fragmentação do DNA; Análise do sêmen; Infertilidade masculina

SUMMARY

Tiseo BC. Evaluation of sexual reproductive hormones, seminal parameters and sperm DNA fragmentation in patients with systemic lupus erythematosus [thesis]. Faculty of Medicine, University of Sao Paulo, SP (Brazil); 2018.

Introduction: Systemic lupus erythematosus (SLE) is a chronic autoimmune disease with a female predominance and have clear impact on fertility. In male SLE has been shown to alter seminal parameters and sexual hormonal levels. Recently, sperm DNA integrity analysis has shown better prognostic performance to predicting male fertility than seminal parameters. **Objective:** To evaluate sperm DNA fragmentation in non-azoospermic male SLE patients. **Methods:** Twenty-eight consecutive male SLE patients (ACR criteria) and 34 healthy controls were evaluated for demographic/exposures data, urologic evaluation, hormone profile and seminal analysis (including sperm DNA fragmentation). Clinical features, disease activity/damage scores and treatment were also assessed. **Results:** Median age [33(20-52) vs. 36.5(25-54) years, $p=0.329$] and frequency of varicocele (25% vs. 32%, $p=0.183$) were similar in SLE patients and healthy controls. Sperm DNA fragmentation showed significantly higher levels of cells class III [44(9-88) vs. 16.5(0-80)%, $p=0.001$] and cell class IV [10.5(3-86) vs. 7(0-36)%, $p=0.039$] in SLE. Sperm DNA fragmentation Index was also significantly higher in SLE patients [62(31-97) vs. 25.5(0-100)%, $p<0.001$]. Conventional sperm parameters (including sperm count, motility and morphology) were similar in both groups. In SLE patients no correlations were observed between sperm DNA fragmentation index with age, disease duration, SLEDAI-2K and SLICC/ACR-DI scores, and cumulative dose of prednisone, hydroxychloroquine, intravenous cyclophosphamide (IVCYC), methotrexate, azathioprine and mycophenolate mofetil ($p>0.05$). Further analysis of SLE patients treated with and without IVCYC showed that total sperm motility was significantly lower in the former group [64%(15-83) vs. 72%(57-86)%, $p=0.024$]. Sperm DNA fragmentation index was alike in both groups [52.5(31-95) vs. 67.5(34-97)%, $p=0.185$]. **Conclusions:** To our knowledge, this is the first demonstration that male non-azoospermic SLE patients have increased sperm DNA fragmentation without evident gonadal

dysfunction. IVCYC does not seem to be a major determinant for this abnormality. Future prospective study is necessary to determine the impact of this alteration in these patients' fertility.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Considerações sobre o lúpus eritematoso sistêmico

O lúpus eritematoso sistêmico (LES) é uma doença autoimune do tecido conectivo, multissistêmica, clinicamente heterogênea, que possui uma ampla variedade de apresentações clínicas. Atinge raramente o gênero masculino (1 masculino: 9 feminino) em idade reprodutiva, iniciando-se mais comumente entre 20 e 40 anos^{1, 2}. Deste modo, envolve questões importantes relacionadas ao potencial de fertilidade desses pacientes³. O LES pode manifestar-se de forma benigna, embora também possa apresentar uma evolução extremamente grave e por vezes fatal. Tem prevalência estimada em 20 a 150 casos por 100.000 indivíduos e no último século sua incidência triplicou devido, em grande parte, a melhora no diagnóstico^{1, 4, 5}. No Brasil não temos dados exatos, mas estima-se que na América do Sul a incidência seja em torno de 1 a 25 casos por 100.000 habitantes⁶.

O diagnóstico precoce por meio de testes laboratoriais mais específicos, a padronização de critérios classificatórios e o surgimento de modalidades terapêuticas mais efetivas para o controle da doença têm contribuído para a melhoria do prognóstico com uma maior sobrevida dos pacientes afetados⁷. Essa maior sobrevida faz com que cada vez mais aumente o interesse em complicações de longo prazo decorrentes da própria doença ou das terapêuticas utilizadas, contribuindo assim para um melhor cuidado e consequentemente uma melhor qualidade de vida nesses pacientes incluindo, neste âmbito, a fertilidade dos indivíduos^{8, 9}.

Nos últimos anos no HC-FMUSP, estudos têm sido realizados para avaliar a função gonadal em pacientes com LES de ambos os gêneros⁹⁻²¹. Claramente, em pacientes do sexo feminino, observa-se uma elevada frequência de falência ovariana precoce além de outras alterações do ciclo menstrual devido tanto às medicações quanto à atividade da doença podendo determinar infertilidade a estas mulheres^{14, 22}. Em homens esta relação não está claramente estabelecida, mas alterações testiculares já foram claramente demonstradas^{19, 20}. Nesse sentido, três publicações recentes foram realizadas pelo nosso grupo com foco no impacto testicular da doença. Suehiro *et al.*

evidenciaram que a função das células de Sertoli em pacientes com LES é alterada afetando a secreção de Inibina B e que a relação Inibina B/hormônio folículo estimulante (FSH) é um marcador precoce de toxicidade do uso da ciclofosfamida no tratamento destes pacientes e pode antecipar o diagnóstico de futuras alterações no perfil hormonal¹⁷. Vecchi *et al.*, investigando antropometria peniana em pacientes com LES, também evidenciaram elevação no FSH e diminuição de testosterona nestes indivíduos assim como diminuição do tamanho e circunferência peniana. Além disso, nesse grupo foram encontrados 4% dos pacientes com Síndrome de Klinefelter, mas nenhum com microdeleção do cromossomo Y¹². Não obstante, Soares *et al.* demonstraram elevada presença de anticorpos antiespermatozoides em pacientes com LES alcançando prevalência de 40%, no entanto, sem nenhuma evidente associação com parâmetros da função gonadal¹⁹. Os autores acreditam que a alteração da fertilidade destes pacientes pode, em parte, ser explicada pela agressão direta aos testículos por estes anticorpos²³.

Sendo assim, o LES tem baixa prevalência no sexo masculino, no entanto, acomete os homens principalmente durante o seu período reprodutivo. As alterações acima citadas, em pacientes com LES, apresentam potencial impacto na fertilidade masculina.

1.2 Considerações sobre a avaliação da fertilidade no homem

A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que aproximadamente 80 milhões de pessoas ao redor do mundo apresentem problemas relacionados à infertilidade²⁴. De acordo com a Sociedade Americana de Medicina Reprodutiva, a infertilidade é considerada uma doença do sistema reprodutor, cujas funções não se encontram em estado normal, que é constatada após um período de doze meses de tentativa de concepção sem sucesso, em que o casal manteve relações sexuais sem a utilização de nenhum método contraceptivo²⁵. Atualmente, estima-se que a infertilidade atinja 10% a 20% dos casais em idade reprodutiva, independente de suas origens étnicas ou sociais²⁶⁻²⁹.

Dentre as causas de infertilidade masculina podemos destacar o hipogonadismo hipogonadotrófico, uso inadvertido de anabolizantes, alterações

genéticas, exposição à gonadotoxinas, varicocele, obstrução do trato reprodutivo incluindo as doenças autoimunes^{30, 31}. Uma das doenças autoimune relacionadas a infertilidade é o LES que apresenta claramente associação em pacientes do sexo feminino, conforme acima descrito, ocorrendo por diversos mecanismos³² sendo o mais comum a irregularidade menstrual que afeta aproximadamente 53% das pacientes³³. No sexo masculino esta relação não é tão evidente, porém alguns estudos, descritos acima, demonstram lesão testicular e alteração na função das células de Sertoli indicando existir uma associação entre LES e alteração da função testicular^{17, 19}.

O advento da fertilização *in vitro* (FIV), divulgado ao mundo inicialmente por Palermo *et al.*, em 1992, incorporou inúmeros benefícios à reprodução humana, possibilitando a paternidade aos homens com infertilidade decorrente de causas graves³⁴. Sendo assim, até mesmo homens com azoospermia não obstrutiva, considerados previamente estéreis, podem gerar seus próprios filhos biológicos por meio da injeção intracitoplasmática de espermatozoide (ICSI) no oócito^{35, 36}. No entanto, os resultados promissores rapidamente difundidos pelo mundo e a possibilidade de sua utilização como forma de tratamento na maior parte das causas de infertilidade masculina, diminuíram o interesse tanto pelo diagnóstico específico de doenças potencialmente curáveis quanto na pesquisa de novas opções de reais tratamentos da infertilidade³⁷.

A avaliação da fertilidade dos homens baseia-se, inicialmente, na avaliação dos parâmetros seminais clássicos. Porém, estes valores tem pouca correlação com o potencial de fertilidade dos indivíduos. Recentemente, o interesse no entendimento e no diagnóstico das alterações da função espermática tem aumentado com o uso de novos testes para esta avaliação. Dentre estes testes, o teste que tem demonstrado maior importância é a avaliação da fragmentação do ácido desoxirribonucleico (DNA) espermático, sendo capaz de prever a fertilidade do indivíduo com maior acurácia^{38, 39}.

1.3 Considerações sobre a fragmentação do DNA espermático

Na última década, ocorreram avanços consideráveis na compreensão do processo reprodutivo masculino nos aspectos biológico, molecular e genético⁴⁰.

Esses avanços ressaltaram a importância do conhecimento da fisiologia do espermatozoide e da compreensão do mecanismo de fertilização, culminando com a introdução de marcadores bioquímicos de função espermática^{41, 42}. Defeitos na função espermática são responsáveis por aproximadamente 20% das causas de infertilidade masculina, envolvendo uma extensa gama de alterações das funções como movimento anormal do flagelo, falha no reconhecimento da zona pelúcida e inibição da fusão do espermatozoide com o oócito⁴³⁻⁴⁸. Apesar da análise seminal ser a ferramenta disponível mais utilizada na rotina de prática clínica, esse exame possui importantes limitações relacionadas à etiologia da disfunção espermática, assim como na determinação da capacidade de fertilização do espermatozoide. Aproximadamente 25% dos homens com análise seminal normal não conseguem engravidar suas parceiras, permanecendo sem diagnóstico da causa da infertilidade e sendo classificados como portadores de infertilidade idiopática⁴⁹. A introdução de novos biomarcadores de função espermática na prática clínica possibilita uma avaliação mais precisa da etiologia da disfunção do espermatozoide, contribuindo para o correto diagnóstico dos casos classificados como idiopáticos. Além disso, marcadores de função espermática podem ser utilizados como fatores prognósticos das taxas de gravidez, tanto espontânea quanto por meio dos métodos de reprodução assistida. Nesse sentido, foram descritos alguns testes nos últimos anos, incluindo avaliação da reação acrossômica, penetração espermática e hemizona, níveis de creatina quinase, radicais livres de oxigênio, citocinas como a interleucina 6, capacidade antioxidante total, peroxidação lipídica e teste de fragmentação do DNA⁵⁰⁻⁵⁸.

Nível aumentado de radicais livres de oxigênio (ROS) também tem sido demonstrado no sêmen de 25% a 40% dos homens inférteis^{59, 60}. Os efeitos danosos das altas concentrações de oxigênio são atribuídos à formação de ROS⁶¹. O metabolismo aeróbico normal está relacionado ao nível ideal de radicais livres que depende do equilíbrio entre os processos de produção e de eliminação desses radicais. Em condições normais, o espermatozoide produz pequenas quantidades de radicais livres necessários à realização de processos fisiológicos normais, como a capacitação, reação acrossômica e fusão do

espermatozoide com o óvulo^{62, 63}. Esses radicais livres gerados são continuamente neutralizados por meio de mecanismos de defesa, sendo o principal deles mediado pelos antioxidantes presentes no plasma seminal⁶⁴. Entretanto, quando ocorre um aumento na produção de radicais livres ou uma insuficiente neutralização pelos antioxidantes, institui-se uma situação denominada estresse oxidativo^{43, 59}. Aparentemente, o desequilíbrio entre ROS e antioxidantes é principalmente secundário ao aumento da produção de ROS, sendo dificilmente causado pela diminuição da capacidade antioxidativa seminal⁴³.

O estresse oxidativo produz um dano extenso nas proteínas e modificações no citoesqueleto, além de inibir mecanismos celulares⁶⁵. Também causa alterações importantes na motilidade dos espermatozoides por danos peroxidativos dos radicais livres à membrana plasmática⁶⁶. A membrana plasmática dos espermatozoides é extremamente sensível aos ROS pela sua composição rica em ácidos graxos poli-insaturados.

Uma das principais consequências do estresse oxidativo é o dano à integridade do DNA do núcleo e ao DNA mitocondrial. O DNA da mitocôndria parece ser mais sensível ao dano oxidativo que o DNA nuclear por não possuir histonas, que exercem um papel protetor no DNA nuclear, e também por apresentar pobre atividade reparadora da DNA polimerase mitocondrial em relação à nuclear⁶⁷. O processo de fertilização em humanos, assim como o desenvolvimento embrionário, depende da integridade do DNA nuclear dos espermatozoides⁶⁸. Diferentemente da estrutura da cromatina das células somáticas, a cromatina espermática é extremamente compactada. Para tanto, nos últimos estágios da espermatogênese, as histonas são trocadas por proteínas de transição e depois por protaminas⁶⁹. As ligações inter e intramoleculares entre as protaminas ricas em cisteína com pontes dissulfídicas permitem uma compactação e estabilização ainda maior do núcleo espermático, protegendo o DNA espermático de fatores externos.

A etiologia do dano ao DNA espermático é multifatorial e pode ocorrer como consequência a fatores intrínsecos ou extrínsecos. Os defeitos intrínsecos que predisõem ao dano do DNA incluem a deficiência de protamina, mutações que afetam adversamente a compactação do DNA, ou

outros defeitos do empacotamento⁷⁰. Espermatozoides que iniciam o processo de apoptose e posteriormente interrompem esse ciclo apresentam um maior dano ao DNA⁷¹. Esse mecanismo é semelhante ao que ocorre com o envelhecimento do homem⁷².

Existe associação entre o aumento dos níveis de ROS no sêmen e as alterações da estrutura do DNA do espermatozoide em homens com diagnóstico de infertilidade⁷³. Fatores externos como o calor, agentes quimioterápicos, radiação e outras gonadotoxinas estão associados com um aumento na quantidade de espermatozoides ejaculados com dano do DNA⁷⁴. De maneira semelhante, infecções do trato reprodutivo, a presença de varicocele, disfunções hormonais e o tabagismo foram previamente relacionados com aumento do dano ao DNA dos espermatozoides, tanto em modelos experimentais, como em humanos⁷⁵⁻⁷⁹. A lesão no DNA nuclear tem sido associada a aumento na taxa de abortos, baixas taxas de fertilidade e também a redução da qualidade seminal. Trabalhos experimentais demonstram que processos autoimunes também levam a dano no DNA do espermatozoide⁸⁰.

A análise da fragmentação do DNA do espermatozoide através da susceptibilidade da cromatina é capaz de fornecer um índice de fragmentação de DNA que se relaciona negativamente com a fertilidade dos pacientes além de prever o potencial para FIV⁸¹. Estudos recentes mostraram a relação da fragmentação do DNA com perda de embrião no primeiro trimestre após FIV⁸², apesar disso, outras publicações não mostraram diminuição na taxa de sucesso de técnicas de reprodução assistida^{83, 84}. Acredita-se que a fragmentação do DNA do espermatozoide deve estar envolvida na alteração do desenvolvimento do embrião e levando a uma menor taxa de evolução dos fetos, apesar do real mecanismo envolvido neste processo não estar totalmente esclarecido⁸⁵.

Atualmente existem 4 métodos para análise da fragmentação do DNA do espermatozoide. A avaliação através de TUNEL assay baseia-se na identificação de quebras na fita de DNA através de inserção de nucleotídeos marcados nestas pontas livres pelo uso de uma enzima chamada TdT transferase e posterior quantificação destes nucleotídeos marcados⁸⁶. No

método SCSA (*Sperm chromatin structure assay*) avalia-se a susceptibilidade da cromatina a ação de solução ácida. Utiliza-se o corante laranja de acridina que marca DNA dupla fita de verde e DNA fita simples em vermelho. Após a exposição a uma solução ácida, o material é corado e levado para avaliação em citômetro de fluxo onde a proporção entre as duas emissões de luz, verde e vermelho, é avaliada⁸⁷. No método de dispersão da cromatina espermática (em inglês: *Sperm chromatin dispersion* - SCD) avalia-se, igualmente ao SCSA, a susceptibilidade da cromatina a solução ácida, porém classifica-se a fragmentação do DNA através da análise da dispersão do halo em gelatina Agar-agar com marcador fluorescente, necessitando apenas de microscópio de campo claro⁸⁸. Já a análise através do COMET assay baseia-se na avaliação individual de células em eletroforese em gel após a quebra da célula em solução salina e detergente. Células com alto grau de fragmentação do DNA apresentam maior dispersão na eletroforese. As células são coradas com corante fluorescentes e avaliadas em microscópio de fluorescência podendo também serem obtidas imagens e estas serem avaliadas por programas automatizados para a classificação da dispersão do DNA⁸⁹.

Recentes estudos compararam as análises de fragmentação de DNA do espermatozoide demonstraram que as análises com TUNEL, SCSA, SCD e COMET são capazes de diferenciar pacientes férteis de inférteis⁹⁰⁻⁹². Atualmente a avaliação através de SCSA é a mais utilizada e com maior normatização entre laboratórios clínicos e experimentais, porém necessita de análise com citômetro de fluxo e tem custo mais elevado⁹³. A análise por meio de COMET compara-se ao SCSA e ao TUNEL na capacidade de correlação com potencial de fertilidade, apresenta custo inferior, não necessita de citômetro de fluxo e tem maior acurácia em definir a fertilidade do indivíduo que todos os outros testes^{91, 94}. Ribas-Maynou J *et al.* demonstraram que o COMET realizado em meio alcalino possui a maior área sobre a curva ROC comparado com os outros testes, tendo assim, um maior valor preditivo positivo e negativo em relação a fertilidade⁸⁵. Deste modo decidimos pelo uso da técnica COMET alcalino em nosso estudo.

1.4 Considerações sobre o uso da ciclofosfamida em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico e seu impacto na fertilidade masculina

A ciclofosfamida é uma droga que foi introduzida no arsenal terapêutico médico em na década de 1960. Desde o início de seu uso sua atividade imunomoduladora foi objeto de grande atenção por parte dos pesquisadores^{95, 96}. Esta droga possuiu efeito alquilante através de seu principal metabolito que é ativado após a passagem no metabolismo hepático mediado pelo citocromo P450⁹⁷, levando a ligação cruzadas entre pontes de guanina na cadeia de duplo fita de DNA acarretando apoptose devido a ruptura do mecanismo celular. Existem três mecanismos propostos para a atividade imunomoduladora da ciclofosfamida: eliminação das células T regulatórias, indução da produção de fatores de crescimento de células T como Interferon ou criação de um nicho imunológico através de células T reativas a tumores⁹⁸.

Estudos iniciais já observaram seu potencial para imunomodulação e também demonstraram seu potencial efeito deletério na fertilidade dos indivíduos^{99, 100}. Particularmente no caso dos pacientes do sexo masculino com LES, observou-se sua associação com azoospermia e outras alterações nos parâmetros seminais^{17, 19}. Sendo assim, acredita-se que exista impacto na fertilidade masculina, apesar de nenhum estudo publicado ter avaliado especificamente este parâmetro.

1.5 Justificativa do projeto

Tendo em vista a falta de acurácia dos parâmetros seminais no auxílio ao diagnóstico de infertilidade, a utilização do nível de fragmentação do DNA no espermatozoide representa um marcador mais sensível e preciso na avaliação da fertilidade masculina^{52, 101, 102}.

Embora estudos tenham relatado a avaliação da função gonadal em homens com LES utilizando parâmetros seminais, avaliação hormonal e volume testicular, na literatura até o presente momento, a avaliação da função espermática por meio da dosagem do nível de fragmentação do DNA do espermatozoide, ainda não foi descrita neste grupo de pacientes.

Deste modo, a dosagem do nível de fragmentação do DNA espermático pode representar um marcador importante na avaliação do potencial de

fertilidade dos pacientes com LES e quantificar o real impacto da doença e das medicações utilizadas no seu tratamento na função testicular deste grupo de pacientes.

2 OBJETIVOS

Os objetivos deste estudo são:

1. Avaliar a fragmentação do DNA dos espermatozoides em homens com LES, assim como análise hormonal reprodutiva e parâmetros seminais.
2. Avaliar o impacto do uso da Ciclofosfamida na fragmentação do DNA espermático dos homens com LES.
3. Avaliar a associação entre o índice de fragmentação do DNA dos espermatozoides em homens lúpicos com manifestações clínicas, atividade da doença, dano cumulativo e terapêuticas utilizadas.

3 PACIENTES E MÉTODOS

3.1 Local do Estudo

Este estudo foi realizado com desenho de caso-controle. Uma amostra de conveniência foi utilizada sendo composta de 40 homens com diagnóstico de LES acompanhados na Disciplina de Reumatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP), com idades entre 18 e 55 anos. O grupo controle foi composto por 40 homens em programação para vasectomia.

As avaliações clínicas foram realizadas no ambulatório de Urologia e no ambulatório de LES da Disciplina de Reumatologia do HC-FMUSP entre outubro de 2016 a janeiro de 2018.

As análises seminais e a dosagem da fragmentação do DNA espermático foram realizadas no laboratório do centro de reprodução humana do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (CRH HC-FMUSP).

3.2 Desenho do estudo

LES: Lúpus eritematoso sistêmico

Figura 1. Desenho do estudo

3.3 Seleção dos pacientes

Foram incluídos pacientes com LES que estavam em acompanhamento na Disciplina de Reumatologia do HC-FMUSP que preenchiam os critérios de classificação do *American college of rheumatology* (ACR) para LES conforme estabelecido pela Systemic lupus collaborating clinics (SLICC) em 2012¹⁰³ e com idade entre 18 e 55 anos.

O grupo controle foi constituído por quarenta homens, provenientes da Divisão de Urologia do HC-FMUSP, que eram sabidamente férteis e que procuraram o departamento espontaneamente a fim de serem submetidos a vasectomia. Os participantes foram incluídos no estudo após assinatura de termo de consentimento esclarecido e informado.

3.4 Cálculo da amostra

Para o cálculo amostral utilizamos a proporção de homens com LES com alterações nos parâmetros seminais de 24% conforme observado por Suehiro RM, *et al*¹⁷, utilizando nível de significância de 5% e poder do teste de 90% obtivemos uma amostra de 29 casos e 29 controles. Optamos por ampliar para 40 indivíduos em cada grupo devido ao risco de azoospermia entre os pacientes e de perda de dados durante o estudo.

3.5 Critérios de exclusão

Os seguintes critérios de exclusão utilizados foram:

- Pacientes vasectomizados;
- Uso de reposição hormonal androgênica;
- História de qualquer neoplasia ou irradiação pélvica;
- Presença de tireoidopatias.
- História prévia de quimioterapia, transplante, doenças consumptivas (câncer, falências orgânicas, tuberculose, infecção por HIV/SIDA);
- Recusa a participação na pesquisa ou a coleta de exames;
- Azoospermia na análise seminal convencional.

3.6 Critérios de avaliação dos indivíduos

Todos os homens foram avaliados conforme os critérios abaixo listados.

3.6.1 Avaliação clínica e demográfica dos indivíduos

- Demográficos e socioeconômico-culturais: idade atual, raça, paternidade;
- Exame físico para mensuração do volume testicular e classificação da varicocele, quando presente;
- Avaliação hormonal incluindo LH, FSH, testosterona total e estradiol;
- Análise seminal com determinação do volume seminal, pH, número total de espermatozoides, concentração espermática, motilidade total, motilidade progressiva, morfologia dos espermatozoides pelo critério estrito de Kruger;
- Análise da fragmentação do DNA espermático;
- Os grupos foram analisados e comparados com objetivo de verificação da homogeneidade de acordo com as seguintes variáveis:
 - Idade;
 - Raça;
 - Índice de massa corpórea (peso/altura² em Kg/cm²);
 - Tabagismo (nunca, pregresso ou atual);
 - Etilismo (nunca, pregresso ou atual);
 - Histórico de DST;
 - Exposição a gonadotoxinas;
 - Presença de varicocele clínica uni ou bilateral.

3.6.2 Avaliação clínica do lúpus eritematoso sistêmico

Os pacientes foram entrevistados pelo médico responsável e por um reumatologista experiente para coleta dos seguintes dados:

- Atividade da doença foi avaliada através da aplicação do escore *Systemic lupus erythematosus disease activity index* 2000 (SLEDAI-2K)¹⁰⁴ e o dano cumulativo através do escore *Systemic lupus*

international collaborating clinics damage index (SLICC-DI/ACR)¹⁰⁵ nos pacientes acometidos.

Os prontuários dos pacientes foram também revisados por um médico reumatologista em conjunto com o médico responsável quanto aos parâmetros:

- Clínico-laboratoriais: idade quando do início da doença, duração e ocorrência de recidiva da doença. Manifestações do LES foram definidas como: lesões cutâneas (exantema malar ou discóide, úlceras orais, vasculites e/ou fotossensibilidade), envolvimento articular (artralgia ou artrite não erosiva), doença neuropsiquiátrica (convulsão, psicose, depressão, ou neuropatia periférica), comprometimento renal (proteinúria $\geq 0,5\text{g}/24\text{h}$, presença de cilindros, hematúria persistente ≥ 10 hemácias por campo ou insuficiência renal), doença cardiopulmonar (serosite, miocardite, doença pulmonar restritiva e hipertensão pulmonar), e anormalidades hematológicas (anemia hemolítica, leucopenia com leucócitos $< 4.000/\text{mm}^3$, linfopenia com linfócitos $< 1.500/\text{mm}^3$ em duas ou mais ocasiões, e trombocitopenia com plaquetas $< 100.000/\text{mm}^3$ na ausência de drogas ou infecção);
- Terapêuticos: uso de corticosteróide, imunossupressores utilizados previamente e quando da inclusão no estudo, (ciclofosfamida, metotrexate, azatioprina, micofenolato e hidroxicloroquina), dose cumulativa de todas as drogas, sendo a dose de corticosteróide calculada em gramas equivalentes de prednisona; tempo de doença; cirurgias prévias;
- Evolução clínica: recidiva da doença, intercorrências clínicas;
- Presença de comorbidades.

3.7 Exame físico

O exame físico urológico foi realizado em todos os homens pelo mesmo examinador. O volume testicular foi aferido com o orquidômetro de Prader¹⁰⁶ (figura 2), com o paciente em decúbito dorsal. Este método gráfico para mensuração do volume testicular utiliza um conjunto de 12 modelos, de forma elipsoide, feitos de plástico com volumes de 1cm^3 , 2cm^3 , 3cm^3 , 4cm^3 , 5cm^3 ,

6cm³, 8cm³, 10cm³, 12cm³, 15cm³, 20cm³ e 25cm³. O volume testicular foi estimado por meio de comparação visual ao conjunto de modelos durante a palpação dos testículos.

Figura 2 - Orquidômetro de Prader

O exame físico para pesquisa de varicocele foi realizado em consultório aquecido, estando os pacientes em posição ortostática e solicitada realização de manobra de Valsalva. A varicocele foi classificada, quando presente, de acordo com o critério modificado de Dubin & Amelar, conforme abaixo¹⁰⁷.

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

3.8 Análise hormonal

Determinações hormonais foram realizadas na inclusão do estudo em pacientes e controles para avaliar a integridade do eixo hipotálamo-hipófise-gônadas, cego para outros parâmetros da função gonadal. LH, FSH, testosterona total e estradiol foram avaliados. Coeficientes de variação intra e inter-ensaio foram limitados a 2,2% a 5,1 e 1,9% a 8,4%, respectivamente. Os valores normais utilizados foram: LH (1,7-8,6UI/L), FSH (1,4-12,8UI/L), testosterona total (249-836ng/dL) e estradiol (25,8-60,7pg/mL).

3.9 Análise seminal

A análise foi realizada de acordo com as normas estabelecidas pela OMS¹⁰⁸. Todas as amostras de sêmen foram coletadas em salas apropriadas para coleta por meio de masturbação. Recipiente plástico de boca larga identificado, estéril e atóxico, foi utilizado na coleta das amostras. Todos os pacientes foram solicitados a realizar a coleta com abstinência sexual de 48 a 120 horas. Os pacientes que apresentaram perda seminal durante a coleta foram submetidos à nova coleta após período adequado de abstinência.

3.9.1 Avaliação macroscópica

3.9.1.1 Volume

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

3.9.1.2 pH

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

3.9.2 Avaliação Microscópica

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

3.9.2.1 Concentração espermática

A concentração espermática foi determinada através de câmaras de contagem do tipo Makler (Makler Counting Chamber – Mid Atlantic Diagnostics, Inc. Mount Laurel, EUA). A câmara de Makler possui uma profundidade de 0,01mm e marcação graduada de 100 quadrados (área total de 1mm²), cada um com 0,1mm x 0,1mm. O volume compreendido na área de 10 quadrados

após a colocação da lamínula é de 0,001 mm³ ou milhão por mL. Sendo assim, a leitura direta da concentração da amostra de sêmen (10⁶/mL) foi realizada pela simples contagem dos espermatozoides presentes na área de dez quadrados. Alíquota de 5µL de sêmen liquefeito foi colocado no centro da câmara de contagem e, após a colocação de lamínula, a contagem foi realizada em microscopia de fase, com aumento de 200 vezes (objetiva x 20). Todos os espermatozoides móveis e imóveis foram contados em três fileiras não consecutivas. A concentração espermática foi determinada pela média da contagem das três fileiras, expressa em milhões de espermatozoides por mililitro de sêmen (10⁶/mL).

3.9.2.2 Número total de espermatozoides

O número total de espermatozoides no sêmen foi determinado pela multiplicação da concentração espermática em milhões por mililitro pelo volume do ejaculado em mililitro. O valor foi descrito em milhões (x 10⁶).

3.9.2.3 Motilidade espermática

A avaliação da motilidade quantitativa e qualitativa, segundo os padrões estipulados pela OMS¹⁰⁸, foi realizada na mesma câmara de contagem Makler com microscopia de fase, em aumento de 200 vezes (objetiva x 20). Alíquota de 5µL de sêmen foi colocada na câmara, sendo realizada avaliação de 100 espermatozoides. Esse procedimento foi realizado duas vezes, sendo que em casos de diferença superior a 10% entre as duas avaliações, uma terceira contagem foi realizada. A média dessas avaliações foi utilizada no cálculo da motilidade. A motilidade espermática foi definida pela multiplicação do número de espermatozoides móveis por 100, dividido pela concentração espermática. O resultado foi expresso em porcentagem.

$$\text{Motilidade espermática(\%)} = \frac{\text{N}^{\circ} \text{ de espermatozoides móveis} \times 100}{\text{N}^{\circ} \text{ de espermatozoides móveis} + \text{imóveis}}$$

Com relação à motilidade qualitativa, os espermatozoides avaliados para a determinação da motilidade quantitativa foram distribuídos nas categorias

motilidade progressiva, móveis e imóveis de acordo com o grau de movimentação. As definições dos graus de motilidade foram classificadas segundo as recomendações da OMS. A motilidade total foi calculada a partir da soma das porcentagens de espermatozoides com respectivas motilidades, conforme recomendações da OMS¹⁰⁹.

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

3.9.2.4 Morfologia espermática

Na avaliação da morfologia espermática, foram preparadas lâminas pela técnica de esfregaço seminal. As lâminas foram coradas por corante tipo Panótico, constituído de três soluções: fixante, corante I e corante II. Cada lâmina foi imersa cinco vezes na primeira solução, após secas, três vezes no corante I, seguido de cinco imersões no corante II. O excesso dos corantes foi retirado com suave gotejamento de água destilada sobre as lâminas. Após a secagem em temperatura ambiente foi aplicado cimento celular (meio de inclusão rápida para microscopia [Entellan, Merck catálogo # 1079610100, São Paulo, Brasil]) para aderência da lamínula, conservando o aspecto do material corado. Duzentas células espermáticas, sob microscopia de imersão (1000x, objetiva x100), foram avaliadas em cada amostra. Segundo o critério estrito, o espermatozoide foi considerado normal quando seu segmento cefálico possuir configuração oval, absolutamente perfeita, medindo entre 5 e 6µm de comprimento e 2,5 e 3,5µm de largura¹¹⁰. Além disso, quando possui o acrossomo bem definido, abrangendo cerca de 40% a 70% da porção cefálica do espermatozoide. Os segmentos cefálicos com formato limítrofe foram considerados anormais, assim como a presença de qualquer vacúolo. A existência de qualquer anormalidade na peça intermediária ou na cauda foi considerada anormal. A peça intermediária foi considerada normal quando se apresentar delgada, anexada à parte central do corpo, medindo menos de 1µm de largura, sendo o comprimento aproximadamente uma vez e meia o do

segmento cefálico. A presença de inclusão citoplasmática também foi considerada anormal. A cauda foi considerada normal quando se apresentar uniforme, ligeiramente mais fina que a peça intermediária, medindo aproximadamente 45µm, não podendo estar em espiral.

3.9.2.5 Teste de leucocitospermia (Endtz)

Esse teste identifica a presença de leucócitos do tipo granulócitos polimorfonucleares. O teste de Endtz foi realizado em todas as amostras juntamente com a avaliação microscópica da concentração e motilidade, porém em microscópio sem contraste de fase, sob aumento de 100x (objetiva x10). Misturou-se em um tubo para microcentrifugação, cor âmbar, 10µL de sêmen liquefeito com 10µL de meio Ham's F-10 com HEPES (Irvine Scientific, catálogo # 99168, Santa Ana, EUA) e 20µL de solução de trabalho de benzidina – Endtz (4,0mL de solução estoque [25mL de Ethanol a 96%, 0,0625 gramas de benzidina – Sigma Chemical CO., catálogo # B3503, St. Louis, EUA - 25mL de água destilada] e 50µL de H₂O₂ a 3%). O tubo foi agitado com o auxílio de um agitador de tubos vortex e colocado em repouso por 5 minutos. Após esse período, 5µL foram colocados na câmara de Makler e observados com aumento de 10x, sem contraste de fase. Todos os granulócitos corados positivamente com peroxidase (neutrófilos, leucócitos polimorfonucleares e macrófagos) tornaram-se marrom escuro. Após a contagem, o número de leucócitos foi multiplicado por 4 (fator de diluição) e dividido por 10, obtendo-se o resultado em milhões por mililitro de sêmen. Duas câmaras foram avaliadas por amostra. Foram considerados valores normais quando inferiores a 1×10^6 leucócitos/mL.

3.10 Análise da fragmentação do DNA dos espermatozoides – *Alkaline COMET Assay*

Após a análise do espermograma, o restante da amostra foi analisado através de uma modificação do método descrito por Hughes *et al.*¹¹¹. Uma lâmina previamente preparada com uma camada de 1mL de agarose normal melting point foi utilizada. Os exames foram realizados em duplicata por paciente. Uma alíquota de esperma foi diluída em agarose com baixo ponto de

derretimento (LMPA – *low-melting point agarose*) a 0,7% até concentração de espermatozoides de $1 \times 10^6/\text{mL}$. Alíquotas de 100 μL foram pipetadas sobre a lâmina de microscopia previamente preparada com agarose normal e coberta com uma lamínula. Aguardou-se 10 minutos para solidificação a 4°C. A matriz de agarose permite trabalhar com o esperma sem fixá-lo em um ambiente de suspensão líquida. As lamínulas foram retiradas e foram recobertas com 200 μL de LMPA e cobertas com lamínula. Aguardou-se 10 minutos para solidificação a 4°C, no escuro conforme figura 3. As lâminas foram, então, cobertas com 1mL de solução de lise (Triton X a 4%, 0,04M DTT, NaCl 2,5M, 0,1M EDTA e Tris base 0,01M, pH 7,5) por 20 minutos no escuro a 4°C conforme figura 4. O processo de denaturação foi interrompido através de lavagem do material com água milli Q por 5 minutos a temperatura ambiente. As lâminas então foram colocadas em cuba de eletroforese e recobertas com solução gelada alcalina para eletroforese (300mM NaOH e 1mM EDTA) a 4°C. Após 20 minutos de período de estabilização, a eletroforese horizontal foi realizada com 35V e 200mA por 20 minutos conforme figura 5. Após o procedimento, as lâminas foram lavadas com solução tampão tris-borato-EDTA (TBE) 3 vezes e fixadas com álcool 70% e 100%. As lâminas foram coradas com corante fluorescente SYBR Green II (Thermo Fischer, número de catálogo S-7564, EUA) para simples fitas de DNA e avaliadas em microscópio de fluorescência (Olympus, BX51, fluorescence microscope, EUA).

Estas lâminas foram avaliadas por um pesquisador treinado e 100 células foram analisadas e categorizadas em 4 padrões: I – Cabeça evidente e pouca cauda ou sem cauda, II- Cabeça pouco apagada e cauda pouco aparente, III – Cabeça pouco evidente e cauda bem arrastada e IV – Cabeça bem pequena e cauda muito arrastada. Células com pequeno cometa ou cometa ausente foram consideradas com DNA pouco fragmentado (classe I e II) (figura 6).

Para esta análise os indivíduos com azoospermia foram excluídos devido a impossibilidade técnica desta avaliação.

Figura 3 – Método de confecção da lâmina para avaliação da fragmentação do DNA do espermatozoide.

Figura 4 – Método para cobertura da lâmina com solução de lise para avaliação da fragmentação do DNA do espermatozoide.

Figura 5 – Método eletroforese em meio alcalino para avaliação da fragmentação do DNA do espermatozoide pelo método COMET.

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

Foi definido então o DFI (índice de fragmentação do DNA, *DNA fragmentation Index*) através da seguinte fórmula $[(III + IV) / (I + II + III + IV)] \times 100$ definido assim a porcentagem de células com fragmentação no DNA.

3.11 Termo de Consentimento livre e esclarecido (TCLE)

O TCLE foi confeccionado em língua portuguesa, sem termos científicos e/ou elaborados, e de fácil compreensão pelos sujeitos de pesquisa. O TCLE foi entregue aos pacientes antes da sua avaliação e da realização dos exames. Todos os dados obtidos no decorrer deste protocolo de pesquisa são confidenciais e o sigilo destes e a privacidade de todos os pacientes foram e serão mantidos. Caso os resultados do ensaio forem publicados, a identidade dos pacientes permanecerá confidencial, conforme exigido pelas normas nacionais e internacionais.

3.12 Coleta dos dados

Os dados do estudo foram coletados e gerenciados usando ferramentas de captura de dados eletrônica da REDCap (*Research Electronic Data Capture*) hospedadas no Instituto Feinstein para pesquisa médica. O REDCap é um aplicativo seguro, baseado na web, projetado para suportar a captura de dados para estudos de pesquisa com interface intuitiva para entrada de dados validados, apresenta trilhas de auditoria para monitoramento de manipulação de dados e possui procedimentos automatizados de exportação para transferências de dados contínuos para pacotes estatísticos usuais e procedimentos para importar dados de fontes externas.

O uso deste software possibilita uma aquisição mais fidedigna e menos sujeita a interferências externas com maior confiabilidade nos dados adquiridos¹¹².

3.13 Análise estatística

As variáveis quantitativas foram descritas como média e desvio padrão, quando apresentavam distribuição normal aferida pelo método de Wilk-Shapiro, no caso de variáveis com distribuição anormal, foram descritas como mediana e intervalo interquartil. Teste t student foi utilizado para comparar médias quando variáveis tinham distribuição normal, já o teste não-paramétrico de Mann-Whitney U foi utilizado para comparar os grupos, nas outras situações, controlando-se o nível de significância pela correção de Bonferroni. As variáveis categóricas são descritas como número ou porcentagem e, neste caso, utiliza-se

o teste qui-quadrado de Pearson ou Kruskal-Wallis. Para as correlações entre variáveis foi utilizado os testes de Pearson, quando distribuição normal, e de Spearman quando a distribuição foi não-normal. Todas as análises estatísticas foram feitas com o programa SAS University Edition® (SAS® Inc; North Carolina, EUA). Todos os testes foram unicaudais e o valor $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

4 RESULTADOS

Foram incluídos 80 indivíduos no estudo, sendo 40 no grupo controle e 40 pacientes com LES. Todos foram devidamente orientados sobre a participação no estudo e concordaram, assinando o TCLE. Três indivíduos do grupo controle tinham doenças crônicas graves e foram excluídos da análise assim como 2 pacientes do grupo LES, especificamente (1) transplante renal e (1) tumor de pulmão. Ademais, 1 indivíduo do grupo controle e 3 pacientes do grupo LES se recusaram a coleta de amostra seminal. Sendo assim, 36 indivíduos do grupo controle e 35 pacientes com LES foram submetidos a avaliação clínica, coleta de exames hormonais e coleta de amostra de sêmen para análise seminal convencional e para análise da fragmentação do DNA dos espermatozoides. Além disso, foram excluídos da análise 2 indivíduos do grupo controle por perda do material da avaliação da fragmentação espermática devido a dificuldades técnicas e, também, 7 pacientes do grupo LES por azoospermia pela impossibilidade técnica de avaliação da fragmentação do DNA do espermatozoide (figura 7). Para os resultados foram então incluídos 34 indivíduos do grupo controle e 28 pacientes com LES.

Foram também realizadas subanálises dentro do grupo de pacientes com LES. Os pacientes foram divididos em dois grupos conforme o uso de ciclofosfamida para comparação das variáveis, sendo 12 pacientes que usaram ciclofosfamida e 16 não que fizeram uso. Além disso foram feitas avaliações de correlação entre tempo de doença, doses cumulativas das medicações, escore de atividade do LES, escore de dano cumulativo de LES, e o índice de fragmentação de DNA espermático.

Figura 7 – Fluxograma dos indivíduos incluídos no projeto durante o processo de exclusões.

4.1 Avaliação clínica e urológica

Na avaliação clínica dos indivíduos submetidos a análise observamos que a população afetada por LES apresentou mesma idade, porém apresenta IMC inferior. No grupo de pacientes com LES, 54% tinham conseguido ter filhos na data da avaliação. Apenas um paciente com LES apresentou infertilidade.

Em relação às demais variáveis não houve diferenças entre os grupos conforme tabela 1.

Tabela 1 - Comparação dos dados demográficos entre os grupos

	LES (n=28)	Controles (n=34)	p
Características demográficas e de exposições			
Idade, anos	33 (15)	36,5 (13)	0,325 [#]
Caucasianos	5 (18)	12 (35)	0,129 ^{&}
IMC, Kg/cm ²	26 (5,4)	28,2 (6,7)	0,043[#]
Tabagismo, atual ou prévio	12 (43)	11 (32)	0,398 ^{&}
Etilismo, atual ou prévio	23 (82)	26 (76)	0,588 ^{&}
DST	2 (7)	2 (6)	0,842 ^{&}
Exposição a gonadotoxinas	2 (7)	6 (18)	0,223 ^{&}
História pregressa de cirurgias	16 (57)	18 (56)	0,921 ^{&}
Avaliação urológica			
Volume Testicular, mL			
Testículo direito	12 (3)	12 (3)	0,929 [#]
Testículo esquerdo	12 (5)	12 (3)	0,817 [#]
Presença de varicocele	7 (25)	11 (32)	0,529 ^{&}

Nota: Valores expressos em mediana (intervalo interquartis) ou número (%); IMC: Índice de massa corpórea; DST: Doença sexualmente transmissível; [#]Teste utilizado: Mann-Whitney U; [&]Teste utilizado: Kruskal-Wallis; *O valor $p < 0,05$ foi considerado significativo.

4.2 Avaliação hormonal

No grupo de pacientes com LES observamos uma mediana estatisticamente maior de LH e testosterona. Em relação FSH e estradiol não houve diferenças entre os grupos conforme tabela 2.

Tabela 2 - Comparação da análise hormonal entre os grupos

	LES (n=28)	Controles (n=34)	p
LH, IU/L	6,25 (3,25)	3,95 (2,1)	0,001
FSH, IU/L	4.4 (3,15)	3,15 (2,2)	0,264
Testosterona total, ng/dL	500 (225)	389 (155)	0,002
Estradiol, pg/mL	26,55 (13,4)	25,85 (14,5)	0,324

Nota: Valores expressos em mediana (intervalo interquartis); LH: Hormônio luteinizante; FSH: Hormônio folículo estimulante; Teste utilizado: Mann-Whitney U; *O valor $p < 0,05$ foi considerado significativo.

4.3 Avaliação da análise seminal

Em relação a análise das variáveis do espermograma não foram observadas diferenças entre os grupos avaliados. Medianas e respectivos valores de *p* estão dispostos na tabela 3.

Tabela 3 - Comparação da análise seminal entre os grupos

	LES (n=28)	Controles (n=34)	p
Abstinência, dias	3 (3)	3 (3)	0,766 [#]
Volume ejaculado, mL	2,5 (1,6)	2,5 (1,5)	0,362 [#]
Concentração, x10 ⁶ /mL	82,5 (108,5)	83,5 (53)	0,826 [#]
Contagem total, x10 ⁶	151,5 (214,2)	203,8 (202,5)	0,416 [#]
Motilidade total, %	70,5 (16)	71 (19)	0,804 [#]
Motilidade progressiva, %	48,5 (24,5)	51 (18)	0,488 [#]
Morfologia estrita de Kruger, %	2,5 (4)	3 (3)	0,737 [#]
Leucocitospermia	3 (11)	2 (6)	0,490 ^{&}

Nota: Valores expressos em mediana (intervalo interquartil) ou número (%); [#]Teste utilizado: Mann-Whitney U; [&]Teste utilizado: Kruskal-Wallis; *O valor *p*<0,05 foi considerado significativo.

4.4 Avaliação da fragmentação do DNA dos espermatozoides

No grupo de pacientes com LES observou-se presença menor de células de classe I e uma presença significativamente maior de células classe III e IV. Além disso, o índice de fragmentação do DNA espermático foi significativamente maior no grupo LES. Dados expostos na tabela 4.

Tabela 4 - Comparação da análise da fragmentação do DNA espermático entre os grupos

	LES (n=28)	Controles (n=34)	p
Células classe I	12 (29)	55 (40)	<0,001
Células classe II	15 (15,5)	15 (15)	0,921
Células classe III	44 (48,5)	16,5 (19)	0,001
Células classe IV	10,5 (16)	7 (9)	0,039
DFI, %	62 (35)	25,5 (25)	<0,001

Nota: Valores expressos em mediana (intervalo interquartis); DFI: Índice de fragmentação do DNA espermático; Teste utilizado: Kruskal-Wallis; *O valor $p < 0,05$ foi considerado significativo.

4.5 Subanálises dentro do grupo LES

4.5.1 Avaliação clínica e urológica

Foi realizada uma subanálise apenas com os pacientes do grupo LES divididos em grupos conforme o uso ou não de ciclofosfamida. O grupo que fez uso de ciclofosfamida apresentou um valor de SLICC/ACR-DI maior. Ademais, nenhum paciente estava em uso atual de ciclofosfamida. Dados dispostos na tabela 5.

Tabela 5 - Comparação dos dados demográficos entre grupos de pacientes com LES separados pelo uso ou não de ciclofosfamida

	Uso de CIC (n=12)	Sem uso de CIC (n=16)	p
Características demográficas e de exposições			
Idade, anos	33,5 (16,5)	32,5 (15)	0,642 [#]
Duração da doença, anos	8,5 (10,5)	4,5 (5)	0,088 [#]
Caucasianos	3 (25)	2 (12,5)	0,401 ^{&}
IMC, Kg/cm ²	27 (5,35)	25,6 (6,15)	0,430 [#]
Paternidade	7 (58,3)	8 (50)	0,667 ^{&}
Tabagismo, atual ou prévio	6 (50)	6 (37,5)	0,516 ^{&}
Etilismo, atual ou prévio	9 (75)	14 (87,5)	0,401 ^{&}
DST	1 (8,3)	1 (6,2)	0,835 ^{&}
Exposição a gonadotoxinas	0 (0)	2 (12,5)	0,212 ^{&}
História pregressa de cirurgias	8 (66,7)	8 (50)	0,386 ^{&}
CrITÉRIOS e escores para LES			
CrITÉrios diagnÓsticos ACR	6 (2)	5,5 (2)	0,886 ^{&}
SLEDAI-2K	0.5 (3)	0 (0)	0,161 ^{&}
SLICC/ACR-DI	1.5 (2,5)	0 (1)	0,020^{&}
Avaliação urolÓgica			
Volume testicular, mL			
Testículo direito	13,5 (4,5)	12 (1,5)	0,325 [#]
Testículo esquerdo	12 (3)	12 (3,5)	0,325 [#]
Presença de varicocele	3 (25)	4 (25)	1,000 ^{&}

Nota: Valores expressos em mediana (intervalo interquartis) ou número (%); CIC: Ciclofosfamida; IMC: Índice de massa corpórea; DST: Doença sexualmente transmissível; LES: Lúpus eritematoso sistêmico; ACR: Colégio Americano de Reumatologia; SLEDAI-2K: Índice de atividade de doença do Lúpus eritematoso sistêmico; SLICC/ACR-DI: Índice de dano das clínicas colaboradoras para lúpus sistêmico; [#]Teste utilizado: Mann-Whitney U; [&]Teste utilizado: Kruskal-Wallis; *O valor $p < 0,05$ foi considerado significativo.

4.5.2 Avaliação hormonal

A comparação entre os grupos não evidenciou diferenças estatisticamente significantes. O valor de estradiol apresentou tendência de elevação no grupo que fez uso de ciclofosfamida, entretanto não foi estatisticamente significativa. Dados na tabela 6.

Tabela 6 - Comparação da análise hormonal entre grupos de pacientes com LES separados pelo uso ou não de ciclofosfamida

	Uso de CIC (n=12)	Sem uso de CIC (n=16)	p
LH, IU/L	5,35 (4,1)	6,6 (2,7)	0,500
FSH, IU/L	2,6 (3,1)	4,85 (1,9)	0,109
Testosterona total, ng/dL	516,5 (274)	484,5 (217)	0,853
Estradiol, pg/mL	30,6 (11,3)	22,8 (14,8)	0,081

Nota: Valores expressos em mediana (intervalo interquartis); CIC: Ciclofosfamida; LH: Hormônio luteinizante; FSH: Hormônio folículo estimulante; Teste utilizado: Mann-Whitney U; *O valor $p < 0,05$ foi considerado significativo.

4.5.3 Avaliação da análise seminal

O grupo que fez uso prévio de ciclofosfamida apresentou um motilidade espermática total inferior ao grupo que não fez uso. Os outros critérios avaliados no espermograma foram semelhantes entre os grupos. Dados dispostos na tabela 7.

Tabela 7 - Comparação da análise seminal entre grupos de pacientes com LES separados pelo uso ou não de ciclofosfamida

	Uso de CIC (n=12)	Sem uso de CIC (n=16)	p
Abstinência, dias	3,5 (2,5)	3 (3)	0,636 [#]
Volume ejaculado, mL	2,2 (1,6)	2,5 (2)	0,797 [#]
Concentração, x10 ⁶ /mL	74,5 (119,5)	91 (97,5)	0,889 [#]
Contagem total, x10 ⁶	151,5 (211)	176,3 (215,5)	0,981 [#]
Motilidade total, %	64 (28)	72 (11)	0,024[#]
Motilidade progressiva, %	37,5 (31)	52 (32)	0,137 [#]
Morfologia estrita de Kruger, %	2,5 (4,5)	2,5 (3)	0,690 [#]
Leucocitospermia	1 (8)	2 (12)	0,729 ^{&}

Nota: Valores expressos em mediana (intervalo interquartis) ou número (%); CIC: Ciclofosfamida; [#]Teste utilizado: Mann-Whitney U; [&]Teste utilizado: Kruskal-Wallis; *O valor $p < 0,05$ foi considerado significativo.

4.5.4 Avaliação da fragmentação do DNA dos espermatozoides

Entre os grupos de pacientes com LES que fizeram ou não uso pregresso de ciclofosfamida não houve diferença da contagem de classes de células na avaliação da fragmentação espermática. Não houve, também diferença entre os grupos em relação ao índice de fragmentação do DNA do espermatozoide. Dados expostos na tabela 8.

Tabela 8 - Comparação da análise da fragmentação do DNA espermático entre grupos de pacientes com LES separados pelo uso ou não de ciclofosfamida

	Uso de CIC (n=12)	Sem uso de CIC (n=16)	p
Células classe I	25 (43)	8,5 (13,5)	0,284
Células classe II	15 (14)	15 (15,5)	0,745
Células classe III	26 (42,5)	51,5 (44)	0,265
Células classe IV	14,5 (20,5)	9 (15,5)	0,254
DFI, %	52,5 (46,5)	67,5 (28,5)	0,185

Nota: Valores expressos em mediana (intervalo interquartis); CIC: Ciclofosfamida; DFI: Índice de fragmentação do DNA Espermático; Teste utilizado: Kruskal-Wallis; *O valor $p < 0,05$ foi considerado significativo.

4.5.5 Avaliação da correlação entre escore de LES, doses cumulativas de medicações e o índice de fragmentação do DNA espermático

Na avaliação da correlação entre a duração da doença e os escores de diagnóstico, atividade e dano cumulativo do LES com o índice de fragmentação do DNA espermático não foi observada associação entre as variáveis. De mesmo modo, não foi observada correlação entre doses cumulativas das medicações utilizadas no tratamento do LES a o índice de fragmentação do DNA espermático. Dados expostos na tabela 9.

Tabela 9 - Comparação da análise da fragmentação do DNA espermático entre grupos de pacientes com LES separados pelo uso ou não de ciclofosfamida

	r	p
Duração da doença	0,227	0,246
Crítérios e escores para LES		
Crítérios diagnósticos ACR	-0,006	0,975
SLEDAI-2K	-0,338	0,078
SLICC/ACR-DI	-0,087	0,661
Dose cumulativas de medicamentos		
Ciclofosfamida	-0,129	0,513
Prednisona	-0,151	0,443
Metotrexato	-0,067	0,734
Azatioprina	0,131	0,506
Micofenolato	-0,080	0,685
Hidroxicloroquina	0,233	0,232

Nota: LES: Lúpus eritematoso sistêmico; r: coeficiente de correlação calculado pelo teste de Spearman; ACR: Colégio Americano de Reumatologia; SLEDAI-2K: Índice de atividade de doença do lúpus eritematoso sistêmico; SLICC/ACR-DI: Índice de dano das clínicas colaboradoras para lúpus sistêmico; *O valor $p < 0,05$ foi considerado significativo.

5 DISCUSSÃO

Nos primórdios da civilização humana a medicina e a superstição eram inseparáveis. O primeiro indício de mudança em nossa história moderna acontece com *Hipócrates*. Em seus ensinamentos fica evidente sua crença que as doenças não seriam obras divinas e deviam ser ocasionadas por motivos naturais. Acreditava que situações que não conseguíamos esclarecer não eram sagradas ou divinas, simplesmente por ele eram ignoradas¹¹³. Sendo assim, é creditado a ele o primórdio do método científico dentro da medicina, o início do estudo das patologias que afligem o homem sob o ponto de vista natural e não sobrenatural¹¹⁴.

O método científico padronizado por meio de formulação de hipóteses através da observação da realidade, e realizações de testes que coloquem a prova sua teoria, coletar os dados com objetividade e finalmente formular uma tese baseada nos achados foi introduzido formalmente por *Francis Bacon*, em seu livro *Novum Organum*. Nessa obra é descrito o sistema lógico que depois fora aprimorado chegando ao método descrito por *René Descartes* em seu livro *Discurso do método*. Isto tornou a ciência reprodutível e mais confiável. Este método tornou possível os avanços que temos atualmente e nesta tese seguimos os mesmos princípios^{115, 116}.

Afim de compreender nossas observações selecionamos amostras de populações para nosso estudo. Utilizamos critérios de inclusão e exclusão que favorecessem a observação do impacto apenas dos objetos de nosso estudo e utilizamos um grupo controle com paternidade comprovada. Consequentemente, excluímos de nossa análise indivíduos com características conhecidas que tenham impacto negativo nos níveis hormonais, parâmetros seminais ou nos níveis de fragmentação de DNA do espermatozoide. Para tanto, utilizamos os critérios de exclusão detalhados na metodologia desse estudo, evitando que outras variáveis pudessem ter impacto na função reprodutiva, principalmente entre o período da última paternidade e a coleta do material para o estudo.

No diagnóstico da infertilidade masculina frequentemente utiliza-se a avaliação dos parâmetros seminais, no entanto, a acurácia desse método na

determinação de fertilidade masculina está muito longe de ser considerada aceitável. Deste modo, tem ocorrido uma busca por novos testes diagnósticos com boa sensibilidade, acurácia e que sejam facilmente padronizados, para melhor avaliar a potencial fértil dos indivíduos. No desenvolvimento ou aprimoramento de qualquer teste discriminativo entre fertilidade ou infertilidade é necessário um grupo como base para comparação. A seleção dos integrantes de grupos chamados de “referência” ou “normais” para análises seminais foi previamente descrita utilizando-se uma ampla variação de critérios, incluindo, homens provenientes da população geral, isto é, sem conhecimento da fertilidade prévia^{117, 118}, homens provenientes de casais atendidos para avaliação de infertilidade conjugal¹¹⁹⁻¹²¹, homens candidatos a realização de vasectomia^{122, 123} e doadores voluntários de sêmen^{124, 125}. Embora o primeiro grupo possa refletir de uma maneira mais fidedigna a população geral, os candidatos a vasectomia possuem os melhores critérios referentes à fertilidade comprovada. Este grupo apresenta proximidade a um grupo ideal de fertilidade, porém a paternidade pode ter sido atingida afastada temporalmente do momento em que a amostra seminal foi obtida para o estudo. A definição de um grupo válido de controle é um dos desafios para a criação de valores de referência para testes seminais.

Interesse maior tem sido dado ao estudo do potencial de fertilidade do pacientes com LES devido a sobrevida dos pacientes pelo melhor controle da doença através de medicamentos de maior eficácia e menores efeitos colaterais. Em estudos recentes observou-se o impacto testicular da doença e da terapêutica empregada no seu controle. A função das células de Sertoli está alterada afetando a secreção de Inibina B e o uso da ciclofosfamida está associado a estas alterações¹⁷. Ocorre também elevação no FSH e diminuição de testosterona nestes indivíduos¹². Além disso, observou-se elevada presença de anticorpos antiespermatozoides em pacientes com LES, no entanto, sem nenhuma associação com parâmetros da função gonadal¹⁹. Deste modo, existem evidências de alteração da função testicular em pacientes com LES, porém o real impacto destas alterações na fertilidade destes homens ainda não está definido. Assim sendo, utilizamos a avaliação da fragmentação do DNA do

espermatozoide com um marcador de maior acurácia do potencial de fertilidade dos homens na avaliação dos pacientes com LES.

Atualmente observa-se um aumento rápido da incidência de obesidade nos países desenvolvidos e principalmente subdesenvolvidos, incluindo o Brasil. Nas últimas décadas, o IMC vem sendo utilizado como uma medida de obesidade nessas populações. Dados epidemiológicos dos Estados Unidos da América mostram que 71% da população masculina está acima do peso ($IMC > 25 \text{ Kg/m}^2$). Dentre as implicações negativas na saúde da população com obesidade, a infertilidade tem tido maior atenção gerando estudos que abordam este aspecto com mais profundidade¹²⁶⁻¹³⁰.

Obesidade e sobrepeso no homem causam alterações no perfil hormonal sexual levando a diminuição de testosterona, SHBG (globulina ligadora de hormônios sexuais), elevação de estradiol e, especialmente nos casos de obesidade, alterações na secreção de gonadotrofinas. Estudos recentes mostram também a alteração nos níveis de Inibina B, que é um importante marcador da espermatogênese¹³¹⁻¹³³.

Se em relação aos níveis hormonais existe significativa evidência do impacto negativo da obesidade, a relação com os parâmetros da análise seminal convencional esta relação ainda é controversa. Estudos mostraram resultados conflitantes quanto aos valores da análise seminal¹³⁴⁻¹³⁷. Um dos maiores estudos neste sentido avaliou 4.400 homens referenciados para um centro de infertilidade e demonstrou a relação inversa do IMC com níveis de testosterona e a relação direta com níveis de estradiol. Porém, evidenciou uma fraca associação negativa do IMC com volume ejaculado, contagem total de espermatozoides e motilidade¹³⁵.

Enquanto publicações mais antigas não conseguiram demonstrar alterações significativas na fragmentação do DNA espermático relacionadas ao IMC^{138, 139}. Mais recentemente, estudo incluindo 483 pacientes observou que a fragmentação do DNA espermático estava elevada apenas nos pacientes com IMC acima de 35 Kg/m^2 , obesidade grau III. No entanto, outro estudo recente incluindo 153 pacientes não mostrou relação entre elevação do IMC e alterações nos parâmetros seminais convencionais ou nos índices de integridade da cromatina espermática^{131, 140}. Em nosso estudo, o grupo de

controles apresentou IMC maior que o grupo de pacientes com LES. Apesar disso, a diferença significativa do índice de fragmentação de DNA dos espermatozoides entre os grupos parece não estar relacionada ao IMC apenas. Isso por que a associação esperada seria positiva com IMC e na nossa avaliação o grupo com maior índice de fragmentação do DNA do espermatozoide foi o grupo com menor IMC, sendo assim, a relação encontrada nesse estudo pode ter sido no máximo, subestimada pela interferência do IMC na análise.

O declínio dos parâmetros seminais tem sido relacionado ao avanço da idade dos homens. Essa relação fica mais evidente após 35 anos de idade do homem com aumento do risco de infertilidade e de abortamentos¹⁴¹. Apesar disso, este achado não é homogêneo na literatura, sendo que alguns autores não encontraram efeito negativo da idade masculina nos parâmetros seminais¹⁴²⁻¹⁴⁴.

Em relação a integridade do DNA do espermatozoides, alguns estudos têm demonstrado uma associação significativa entre a idade e elevação dos ROS, além disso, índices elevados de fragmentação do DNA do espermatozoide foram demonstrados em grupos de pacientes com mais idade. O efeito destas alterações tem sido alvo de debate dentro da literatura quanto a seu real impacto em resultados de técnicas de reprodução assistida, porém seu efeito deletério para gestações espontâneas vem sendo cada vez mais solidificado¹⁴⁵⁻¹⁵⁰. Em nossa avaliação observamos similaridade entre as medianas de idade dos grupos, controlando assim o possível efeito de confusão em nossa análise.

Outra variável a qual utilizamos para certificar homogeneidade entre os grupos foi a presença de varicocele clínica nos indivíduos. Dentre a população geral a sua incidência é de aproximadamente 15%, em pacientes com infertilidade atinge 40%. No entanto, essa incidência chega a 80% no grupo de paciente com infertilidade secundária, ou seja, aqueles que já tiveram ao menos um filho e apresentam dificuldade em conseguir uma nova gestação, sugerindo assim uma associação mais forte entre a presença de varicocele e o desenvolvimento de infertilidade masculina. Além disso, o impacto da varicocele na fertilidade dos homens tem sido demonstrado em diversos

estudos nos quais o seu tratamento leva a melhora de parâmetros seminais e, de maneira mais importante, melhora das taxas de gestação espontânea destes pacientes. Três recentes meta-análises, acessando estudos que trataram varicocele clínica, evidenciaram que o tratamento da varicocele, independente do método, apresenta impacto positivo nos parâmetro seminais convencionais ratificando o efeito deletério que a varicocele apresenta na espermatogênese¹⁵¹⁻¹⁵⁷.

A presença de varicocele também está associada a elevados índices de fragmentação do DNA espermático. Uma revisão sistemática incluindo 6 estudos e totalizando 279 indivíduos foi evidenciado que o grupo com varicocele apresentou elevação da fragmentação do DNA espermático em relação ao grupo de controles saudáveis. Outro recente estudo, incluindo 593 homens, os autores demonstraram a elevada taxa de fragmentação do DNA espermático em pacientes com varicocele. Além disso, usando uma curva ROC com os valores desta avaliação, os autores identificaram os pacientes com varicocele com acurácia de 94%. Estes dados deixam evidente a relação entre varicocele e a degradação do DNA espermático^{158, 159}. Em nosso estudo, os grupos avaliados tiveram prevalência semelhante de varicocele. Sendo assim, as diferenças encontradas nos índices de fragmentação do DNA dos espermatozoides entre os grupos não podem ser imputadas a esta variável.

Na literatura médica atual, este é o primeiro estudo a demonstrar aumento na fragmentação do DNA espermático em pacientes com LES. A principal força do presente estudo foi estudar simultaneamente a fragmentação do DNA espermático por meio de uma técnica padronizada¹⁶⁰ associada a análise da função gonadal e da análise seminal convencional. A inclusão de um grupo comprovadamente fértil com idade, prevalência de varicocele e exposição ao meio ambiente similar ao grupo em estudo foi significativa, dado que estes são fatores comprovadamente associados a efeitos adversos na qualidade seminal e com impacto na fertilidade dos indivíduos¹⁶¹. O controle para cirurgias prévias, disfunções do eixo hipotálamo-pituitário-gonadal e insuficiência renal crônica também ajudaram a evitar outras causas que pudessem levar a disfunção testicular^{9, 12, 17, 19, 20, 162}.

O grupo de pacientes com LES apresentou mediana de LH mais elevada que o grupo controle assim como de testosterona. Elevação do LH evidenciaria um déficit na função gonadal, porém os valores não estavam acima do valor da normalidade. Assim como os valores de testosterona que se mostraram maiores que o grupo controle, entretanto não houve valores abaixo do normal no grupo controle o que denotaria hipogonadismo. Deste modo, a função gonadal pode ser considerada pouco alterada no grupo com LES.

Importante salientar que demonstramos aqui, que a integridade do DNA do espermatozoide está alterada em pacientes com LES, indicando que a disfunção espermática está provavelmente relacionada a danos ao núcleo dos espermatozoides. O provável mecanismo para este achado conforme a literatura atual é o desequilíbrio entre produção de espécies reativas de oxigênio e a concentração de substâncias antioxidantes resulta em estresse oxidativo elevado com consequente lesão da membrana plasmática do espermatozoide. Essa situação resulta na fragmentação do genoma mitocondrial e do DNA nuclear além de desregulação da transcrição de RNA mensageiros e dos níveis de transcrição do RNA¹⁶³.

A fragmentação do DNA espermático pode estar elevada mesmo em pacientes com parâmetros seminais normais ou infertilidade idiopática. Sendo assim, a avaliação deste índice traz importante contribuição a avaliação do homem infértil já que este grupo de paciente pode não apresentar uma alteração nos valores da análise seminal convencional, porém podem apresentar alteração na função espermática. Deste modo, a avaliação da fragmentação do DNA dos espermatozoides adiciona importante variável no estudo do potencial de fertilidade do homem, haja visto os achados do presente estudo e as evidências do potencial efeito deletério da elevada fragmentação do DNA espermático conforme exposto anteriormente¹⁶⁴⁻¹⁶⁷.

A função gonadal normal, com parâmetros seminais adequados, níveis hormonais e volumes testiculares normais em pacientes pós-puberais com LES encontrados no presente estudo contrasta com publicações anteriores do nosso grupo que mostrou função testicular alterada assim como anormalidades seminais, FSH e LH elevados e volume testicular diminuído nos homens com LES associado a terapia com ciclofosfamida^{12, 17, 19, 20}.

O efeito deletério da ciclofosfamida no potencial de fertilidade de homens tem sido demonstrado desde 1972 com os primeiros relatos de casos de azoospermia associada ao uso da medicação. Em 1985, em um estudo com 30 homens após 12,8 anos, em média, do uso de ciclofosfamida observou-se alterações na concentração de espermatozoides em 13 pacientes sendo que 9 deles apresentaram azoospermia nesta avaliação. Além disso observou-se uma relação inversa entre concentração espermática e tempo de uso e dose cumulativa da medicação. Em um estudo mais recente incluindo 17 pacientes que fizeram uso de ciclofosfamida em altas doses para síndrome nefrótica idiopática, 6 apresentaram alterações no espermograma sendo 5 deles azoospermicos. Estas alterações também foram relacionadas diretamente a dose cumulativa e a duração do tratamento com ciclofosfamida. De maneira interessante, no subgrupo de pacientes em que a contagem de espermatozoide não foi afetada, não se observou alteração nos níveis de hormônios sexuais em concordância com os nossos achados¹⁶⁸⁻¹⁷⁰.

No presente estudo apenas encontramos uma menor motilidade total espermática no grupo que fez uso de ciclofosfamida, o que difere dos achados dos estudos referidos anteriormente. Estes achados conflitantes com a literatura prévia podem estar relacionados a seleção da amostra do nosso estudo com a exclusão de pacientes com LES que apresentavam azoospermia, excluindo assim, pacientes com alterações mais severas que foram incluídos nas análises de estudos anteriores. Ademais, o uso de ciclofosfamida não parece ter um efeito preponderante no mecanismo pelo qual ocorre dano no DNA do espermatozoide de pacientes com LES que não apresentem azoospermia.

Entretanto, uma das limitações do nosso estudo foi a amostra pequena de conveniência que obtivemos devido aos restritos critérios de inclusão e exclusão. Além disso, há de se considerar que obtivemos apenas uma amostra hormonal e uma amostra seminal de cada homem incluído. Apesar da variação circadiana e sazonal dos hormônios sexuais, uma análise demonstrou-se suficiente para uma avaliação adequada do nível de testosterona de um indivíduo e também para uma avaliação a longo prazo dos outros parâmetros

hormonais. Em relação a análise seminal, a avaliação com mais de uma amostra não se mostrou superior a avaliação com apenas uma¹⁷¹⁻¹⁷⁴.

A atividade da doença não afetou a espermatogênese ou a integridade do DNA espermático em pacientes com LES como previamente reportado^{12, 17, 19, 20}. Orquite autoimune subclínica com produção de autoanticorpos e liberação de citocinas pode afetar negativamente a fertilidade do homem^{23, 175}, apesar da presença de anticorpos antiespermatozoides não ter sido associada a alterações na análise seminal convencional em homens com LES^{17, 19}.

O LES no homem ocorre frequentemente no início da idade adulta, durante o período fértil deste indivíduos, com alta prevalência entre 20 e 50 anos de idade^{176, 177}. A demonstração de alteração funcional dos espermatozoides de pacientes, nesta faixa etária, mesmo quando não apresentem alterações na análise seminal convencional e sua independência do uso de medicamentos ou da atividade da doença sugerem que exista algum aspecto intrínseco a patogênese da doença que leva a aumento da fragmentação do DNA espermático. Até o presente momento, na literatura médica, não há evidência que explique o mecanismo de lesão ao DNA do espermatozoide neste grupo de pacientes. Assim sendo, deve-se atentar a fertilidade destes indivíduos independentemente da gravidade da doença ou da terapêutica empregada no seu tratamento e controle.

6 CONCLUSÕES

O grupo de homens com LES não apresentou diferença nos parâmetros seminais ou hormonais quando comparados ao grupo controle de homens férteis. No entanto, o grupo de pacientes com LES apresentou maior índice de fragmentação do DNA espermático em relação ao grupo controle.

O uso de ciclofosfamida não foi associado a alteração na fragmentação do DNA espermática nos homens lúpicos. Além disso, não houve correlação entre o índice de fragmentação do DNA espermático com manifestações clínicas, escores de atividade da doença, escore de dano cumulativo ou doses cumulativas das medicações utilizadas no controle do LES.

Novos estudos são necessários para avaliar o impacto da alteração da integridade do DNA espermático na fertilidade dos pacientes com LES.

7 ANEXOS

Anexo 1 – Parecer de aprovação do projeto de pesquisa

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA
FACULDADE DE MEDICINA DA
USP - HCFMUSP

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação da função gonadal, dos parâmetros seminais e da função espermática em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico.

Pesquisador: Marcello Antonio Signorelli Cocuzza

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP;);

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

(Reprodução Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP;);

Versão: 2

CAAE: 26806714.0.0000.0068

Instituição Proponente: HOSPITAL DAS CLINICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA U S P

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 576.374

Data da Relatoria: 09/04/2014

Apresentação do Projeto:

Trata-se de projeto de Doutorado que analisará dados reprodutivos de homens com Lúpus Eritematoso Sistêmico. Os parâmetros são clínicos e laboratoriais (espermograma e fragmentação de DNA do espermatozoide). Numa primeira parte será realizada uma análise transversal de 20 pacientes com Lúpus em seguimento e 20 indivíduos considerados normais que procuram o setor para realizar vasectomia. Num segundo momento, 20 pacientes novos ingressantes no ambulatório serão acompanhados prospectivamente.

Objetivo da Pesquisa:

1. Avaliar prospectivamente a fragmentação do DNA dos espermatozoides em homens jovens com Lúpus Eritematoso Sistêmico, assim como parâmetros da função gonadal.
2. Verificar possível associação da fragmentação do DNA dos espermatozoides e dos parâmetros

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar

Bairro: Cerqueira Cesar

CEP: 05.403-010

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)2661-7585

Fax: (11)2661-7585

E-mail: marcia.carvalho@hc.fm.usp.br

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA
FACULDADE DE MEDICINA DA
USP - HCFMUSP

Continuação do Parecer: 576.374

seminais em homens com Lupus Eritematoso Sistêmico com: manifestações clínicas, atividade da doença, dano cumulativo e terapêuticas utilizadas.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os riscos são baixos e pode haver benefício de detecção de alterações ligadas aos testículos e à função reprodutiva, com encaminhamento para o tratamento adequado.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa relevante que agregará informação sobre disfunção gonadal em uma população específica (homens com Lúpus Eritematoso Sistêmico) e sobre um método ainda investigativo (fragmentação do DNA)

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Adequados

Recomendações:

Aprovar

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Aprovado

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

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

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar

Bairro: Cerqueira Cesar

CEP: 05.403-010

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)2661-7585

Fax: (11)2661-7585

E-mail: marcia.carvalho@hc.fm.usp.br

Anexo 2 – Termo de aprovação para bolsa doutorado sanduíche

TERMO DE APROVAÇÃO E DE RESPONSABILIDADE - PDSE

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES
SBN, Quadra 02, Lote 06, Bloco L
70.040-020 Brasília – DF

Pelo presente termo eu, Alberto Azoubel Antunes de nacionalidade brasileira, residente e domiciliado em Av. Armando Ferrentini, 285 no Bairro da Aclimação de CEP: 04103-030, na cidade de São Paulo, portador do CPF 770.695.604-00, orientador da tese de Bruno Camargo Tiseo em programa de Doutorado na Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, aprovo o plano e o cronograma de atividades a serem realizadas pelo orientando Bruno Camargo Tiseo, no Massachussets General Hospital, no período de 01/07/2014 a 31/12/2014 como parte dos estudos que desenvolve no Brasil sobre o tema Avaliação da função gonadal, dos parâmetros seminais e da função espermática em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico.

Assumo o compromisso de manter a orientação e o acompanhamento do estudante, durante o período de realização do estágio no exterior, em conjunto com o coorientador da instituição estrangeira, na condução das atividades propostas no plano e cronograma ora aprovados, envidando esforços para que o estudante apresente o empenho desejado, visando tornar proveitosas as atividades desenvolvidas no exterior, que serão avaliadas por meio de relatórios periódicos.

Caso o estudante obtenha bolsa da CAPES, assumo também a responsabilidade de realçar a relevância de atendimento pelo doutorando dos compromissos e obrigações assumidos quando da assinatura de termo próprio perante essa agência, à época da implementação dos benefícios.

Prazo para a Defesa: Abril de 2018

Local: São Paulo — Data: 26/05/14. Assinatura do Orientador: _____

Prof. Dr. Alberto Azoubel Antunes
Coordenador do Programa de
Pós-Graduação em
Ciências - Urologia

8 REFERÊNCIAS

1. Chakravarty EF, Bush TM, Manzi S, Clarke AE, Ward MM. Prevalence of adult systemic lupus erythematosus in California and Pennsylvania in 2000: estimates obtained using hospitalization data. *Arthritis and rheumatism*. 2007;56(6):2092-4.
2. Lockshin MD. Sex differences in autoimmune disease. *Lupus*. 2006;15(11):753-6.
3. Weckerle CE, Niewold TB. The unexplained female predominance of systemic lupus erythematosus: clues from genetic and cytokine studies. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2011;40(1):42-9.
4. Pons-Estel GJ, Alarcon GS, Scofield L, Reinlib L, Cooper GS. Understanding the epidemiology and progression of systemic lupus erythematosus. *Seminars in arthritis and rheumatism*. 2010;39(4):257-68.
5. Uramoto KM, Michet CJ, Jr., Thumboo J, Sunku J, O'Fallon WM, Gabriel SE. Trends in the incidence and mortality of systemic lupus erythematosus, 1950-1992. *Arthritis and rheumatism*. 1999;42(1):46-50.
6. Danchenko N, Satia JA, Anthony MS. Epidemiology of systemic lupus erythematosus: a comparison of worldwide disease burden. *Lupus*. 2006;15(5):308-18.
7. Thanou A, Merrill JT. Treatment of systemic lupus erythematosus: new therapeutic avenues and blind alleys. *Nature reviews Rheumatology*. 2013.
8. Mersereau J, Dooley MA. Gonadal failure with cyclophosphamide therapy for lupus nephritis: advances in fertility preservation. *Rheumatic diseases clinics of North America*. 2010;36(1):99-108, viii.
9. Silva CA, Brunner HI. Gonadal functioning and preservation of reproductive fitness with juvenile systemic lupus erythematosus. *Lupus*. 2007;16(8):593-9.
10. Rabelo-Junior CN, Bonfa E, Carvalho JF, Cocuzza M, Saito O, Abdo CH, et al. Penile alterations with severe sperm abnormalities in antiphospholipid syndrome associated with systemic lupus erythematosus. *Clin Rheumatol*. 2013;32(1):109-13.

11. Aikawa NE, Sallum AM, Pereira RM, Suzuki L, Viana VS, Bonfa E, et al. Subclinical impairment of ovarian reserve in juvenile systemic lupus erythematosus after cyclophosphamide therapy. *Clin Exp Rheumatol*. 2012;30(3):445-9.
12. Vecchi AP, Borba EF, Bonfa E, Cocuzza M, Pieri P, Kim CA, et al. Penile anthropometry in systemic lupus erythematosus patients. *Lupus*. 2011;20(5):512-8.
13. Araujo DB, Borba EF, Abdo CH, Souza Lde A, Goldenstein-Schainberg C, Chahade WH, et al. [Sexual function in rheumatic diseases]. *Acta reumatologica portuguesa*. 2010;35(1):16-23.
14. Silva CA, Deen ME, Febrônio MV, Oliveira SK, Terreri MT, Sacchetti SB, et al. Hormone profile in juvenile systemic lupus erythematosus with previous or current amenorrhea. *Rheumatology international*. 2011;31(8):1037-43.
15. Pereira RM, de Carvalho JF, de Medeiros AC, Silva CA, Capelozzi V, Bonfa E. Ovarian necrotizing vasculitis in a patient with lupus. *Lupus*. 2009;18(14):1313-5.
16. Medeiros PB, Febrônio MV, Bonfa E, Borba EF, Takiuti AD, Silva CA. Menstrual and hormonal alterations in juvenile systemic lupus erythematosus. *Lupus*. 2009;18(1):38-43.
17. Suehiro RM, Borba EF, Bonfa E, Okay TS, Cocuzza M, Soares PM, et al. Testicular Sertoli cell function in male systemic lupus erythematosus. *Rheumatology (Oxford)*. 2008;47(11):1692-7.
18. Silva CA, Hilario MO, Febrônio MV, Oliveira SK, Terreri MT, Sacchetti SB, et al. Risk factors for amenorrhea in juvenile systemic lupus erythematosus (JSLE): a Brazilian multicentre cohort study. *Lupus*. 2007;16(7):531-6.
19. Soares PM, Borba EF, Bonfa E, Hallak J, Correa AL, Silva CA. Gonad evaluation in male systemic lupus erythematosus. *Arthritis and rheumatism*. 2007;56(7):2352-61.
20. Silva CA, Hallak J, Pasqualotto FF, Barba MF, Saito MI, Kiss MH. Gonadal function in male adolescents and young males with juvenile onset systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol*. 2002;29(9):2000-5.

21. Silva CA, Leal MM, Leone C, Simone VP, Takiuti AD, Saito MI, et al. Gonadal function in adolescents and young women with juvenile systemic lupus erythematosus. *Lupus*. 2002;11(7):419-25.
22. Shelling AN. Premature ovarian failure. *Reproduction*. 2010;140(5):633-41.
23. Silva CA, Cocuzza M, Borba EF, Bonfa E. Cutting-edge issues in autoimmune orchitis. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2012;42(2):256-63.
24. Daar AS, Merali Z. Infertility and social suffering: the case of ART in developing countries. In: Vayena E, Rowe P, Griffin P, editors. *Current practices and controversies in assisted reproduction*. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2002. p. 15-21.
25. Definition of "infertility". *Fertility and sterility*. 2006;86(5 Suppl):S228.
26. Zargar AH, Wani AI, Masoodi SR, Laway BA, Salahuddin M. Epidemiologic and etiologic aspects of primary infertility in the Kashmir region of India. *Fertility and sterility*. 1997;68(4):637-43.
27. Schmidt L, Munster K. Infertility, involuntary infecundity, and the seeking of medical advice in industrialized countries 1970-1992: a review of concepts, measurements and results. *Human reproduction*. 1995;10(6):1407-18.
28. Social determinants of human reproduction. *Human reproduction*. 2001;16(7):1518-26.
29. Jarow J, M. S. Office evaluation of the infertile male. *AUA Update Series*. 1999;18:177-84.
30. Stahl PJ, Stember DS, Goldstein M. Contemporary management of male infertility. *Annual review of medicine*. 2012;63:525-40.
31. Freire EAM, Nepomuceno JdCA, Maia IdO, Ciconelli RM. Doenças reumáticas e infertilidade masculina. *Revista Brasileira de Reumatologia*. 2006;46:12-20.
32. Hickman RA, Gordon C. Causes and management of infertility in systemic lupus erythematosus. *Rheumatology (Oxford)*. 2011;50(9):1551-8.
33. Pasoto SG, Mendonca BB, Bonfa E. Menstrual disturbances in patients with systemic lupus erythematosus without alkylating therapy: clinical, hormonal and therapeutic associations. *Lupus*. 2002;11(3):175-80.

34. Honig SC, Lipshultz LI, Jarow J. Significant medical pathology uncovered by a comprehensive male infertility evaluation. *Fertility and sterility*. 1994;62(5):1028-34.
35. Devroey P, Liu J, Nagy Z, Tournaye H, Silber SJ, Van Steirteghem AC. Normal fertilization of human oocytes after testicular sperm extraction and intracytoplasmic sperm injection. *Fertility and sterility*. 1994;62(3):639-41.
36. Silber SJ, Van Steirteghem AC, Liu J, Nagy Z, Tournaye H, Devroey P. High fertilization and pregnancy rate after intracytoplasmic sperm injection with spermatozoa obtained from testicle biopsy. *Human reproduction*. 1995;10(1):148-52.
37. Shefi S, Turek PJ. Definition and current evaluation of subfertile men. *International braz j urol : official journal of the Brazilian Society of Urology*. 2006;32(4):385-97.
38. Malic Voncina S, Golob B, Ihan A, Kopitar AN, Kolbezen M, Zorn B. Sperm DNA fragmentation and mitochondrial membrane potential combined are better for predicting natural conception than standard sperm parameters. *Fertility and sterility*. 2016;105(3):637-44 e1.
39. Muratori M, Marchiani S, Tamburrino L, Cambi M, Lotti F, Natali I, et al. DNA fragmentation in brighter sperm predicts male fertility independently from age and semen parameters. *Fertility and sterility*. 2015;104(3):582-90 e4.
40. Aitken RJ, Koopman P, Lewis SE. Seeds of concern. *Nature*. 2004;432(7013):48-52.
41. Huszar G, Sbracia M, Vigue L, Miller DJ, Shur BD. Sperm plasma membrane remodeling during spermiogenetic maturation in men: relationship among plasma membrane beta 1,4-galactosyltransferase, cytoplasmic creatine phosphokinase, and creatine phosphokinase isoform ratios. *Biol Reprod*. 1997;56(4):1020-4.
42. Aitken RJ, Krausz C. Oxidative stress, DNA damage and the Y chromosome. *Reproduction*. 2001;122(4):497-506.
43. Sharma RK, Agarwal A. Role of reactive oxygen species in male infertility. *Urology*. 1996;48(6):835-50.
44. Aitken RJ, Sawyer D. The human spermatozoon--not waving but drowning. *Adv Exp Med Biol*. 2003;518:85-98.

45. Miesel R, Drzejczak PJ, Kurpisz M. Oxidative stress during the interaction of gametes. *Biol Reprod.* 1993;49(5):918-23.
46. Aitken RJ, Best FS, Richardson DW, Djahanbakhch O, Lees MM. The correlates of fertilizing capacity in normal fertile men. *Fertility and sterility.* 1982;38(1):68-76.
47. Aitken RJ, Best FS, Richardson DW, Djahanbakhch O, Mortimer D, Templeton AA, et al. An analysis of sperm function in cases of unexplained infertility: conventional criteria, movement characteristics, and fertilizing capacity. *Fertility and sterility.* 1982;38(2):212-21.
48. Lundin K, Soderlund B, Hamberger L. The relationship between sperm morphology and rates of fertilization, pregnancy and spontaneous abortion in an in-vitro fertilization/intracytoplasmic sperm injection programme. *Human reproduction.* 1997;12(12):2676-81.
49. Greenberg SH, Lipshultz LI, Wein AJ. Experience with 425 subfertile male patients. *The Journal of urology.* 1978;119(4):507-10.
50. Hallak J, Sharma RK, Pasqualotto FF, Ranganathan P, Thomas AJ, Jr., Agarwal A. Creatine kinase as an indicator of sperm quality and maturity in men with oligospermia. *Urology.* 2001;58(3):446-51.
51. Siciliano L, Tarantino P, Longobardi F, Rago V, De Stefano C, Carpino A. Impaired seminal antioxidant capacity in human semen with hyperviscosity or oligoasthenozoospermia. *Journal of andrology.* 2001;22(5):798-803.
52. Agarwal A, Sharma RK, Nallella KP, Thomas AJ, Jr., Alvarez JG, Sikka SC. Reactive oxygen species as an independent marker of male factor infertility. *Fertility and sterility.* 2006;86(4):878-85.
53. Alvarez JG, Touchstone JC, Blasco L, Storey BT. Spontaneous lipid peroxidation and production of hydrogen peroxide and superoxide in human spermatozoa. Superoxide dismutase as major enzyme protectant against oxygen toxicity. *Journal of andrology.* 1987;8(5):338-48.
54. Yanagimachi R, Yanagimachi H, Rogers BJ. The use of zona-free animal ova as a test-system for the assessment of the fertilizing capacity of human spermatozoa. *Biol Reprod.* 1976;15(4):471-6.

55. Coddington CC, Franken DR, Burkman LJ, Oosthuizen WT, Kruger T, Hodgen GD. Functional aspects of human sperm binding to the zona pellucida using the hemizona assay. *Journal of andrology*. 1991;12(1):1-8.
56. de Lamirande E, Gagnon C. Human sperm hyperactivation and capacitation as parts of an oxidative process. *Free radical biology & medicine*. 1993;14(2):157-66.
57. Burrows PJ, Schrepferman CG, Lipshultz LI. Comprehensive office evaluation in the new millennium. *The Urologic clinics of North America*. 2002;29(4):873-94.
58. Evenson DP, Jost LK, Marshall D, Zinaman MJ, Clegg E, Purvis K, et al. Utility of the sperm chromatin structure assay as a diagnostic and prognostic tool in the human fertility clinic. *Human reproduction*. 1999;14(4):1039-49.
59. de Lamirande E, Gagnon C. Impact of reactive oxygen species on spermatozoa: a balancing act between beneficial and detrimental effects. *Human reproduction*. 1995;10 Suppl 1:15-21.
60. Padron OF, Brackett NL, Sharma RK, Lynne CM, Thomas AJ, Jr., Agarwal A. Seminal reactive oxygen species and sperm motility and morphology in men with spinal cord injury. *Fertility and sterility*. 1997;67(6):1115-20.
61. Aitken RJ. The Amoroso Lecture. The human spermatozoon--a cell in crisis? *J Reprod Fertil*. 1999;115(1):1-7.
62. Lewis SE, Boyle PM, McKinney KA, Young IS, Thompson W. Total antioxidant capacity of seminal plasma is different in fertile and infertile men. *Fertility and sterility*. 1995;64(4):868-70.
63. Sies H. Strategies of antioxidant defense. *Eur J Biochem*. 1993;215(2):213-9.
64. Agarwal A, Prabakaran SA. Mechanism, measurement, and prevention of oxidative stress in male reproductive physiology. *Indian J Exp Biol*. 2005;43(11):963-74.
65. Sanocka D, Kurpysz M. Reactive oxygen species and sperm cells. *Reproductive biology and endocrinology : RB&E*. 2004;2:12.

66. Jones R, Mann T, Sherins R. Peroxidative breakdown of phospholipids in human spermatozoa, spermicidal properties of fatty acid peroxides, and protective action of seminal plasma. *Fertility and sterility*. 1979;31(5):531-7.
67. Nagakawa Y, Williams GM, Zheng Q, Tsuchida A, Aoki T, Montgomery RA, et al. Oxidative mitochondrial DNA damage and deletion in hepatocytes of rejecting liver allografts in rats: role of TNF-alpha. *Hepatology*. 2005;42(1):208-15.
68. Ahmadi A, Ng SC. Fertilizing ability of DNA-damaged spermatozoa. *The Journal of experimental zoology*. 1999;284(6):696-704.
69. Balhorn R. A model for the structure of chromatin in mammalian sperm. *The Journal of cell biology*. 1982;93(2):298-305.
70. Carrell DT, Liu L. Altered protamine 2 expression is uncommon in donors of known fertility, but common among men with poor fertilizing capacity, and may reflect other abnormalities of spermiogenesis. *Journal of andrology*. 2001;22(4):604-10.
71. Sakkas D, Seli E, Bizzaro D, Tarozzi N, Manicardi GC. Abnormal spermatozoa in the ejaculate: abortive apoptosis and faulty nuclear remodelling during spermatogenesis. *Reproductive biomedicine online*. 2003;7(4):428-32.
72. Singh NP, Muller CH, Berger RE. Effects of age on DNA double-strand breaks and apoptosis in human sperm. *Fertility and sterility*. 2003;80(6):1420-30.
73. Zini A, de Lamirande E, Gagnon C. Reactive oxygen species in semen of infertile patients: levels of superoxide dismutase- and catalase-like activities in seminal plasma and spermatozoa. *International journal of andrology*. 1993;16(3):183-8.
74. Cocuzza M, Sikka SC, Athayde KS, Agarwal A. Clinical relevance of oxidative stress and sperm chromatin damage in male infertility: an evidence based analysis. *International braz j urol : official journal of the Brazilian Society of Urology*. 2007;33(5):603-21.
75. Xing W, Krishnamurthy H, Sairam MR. Role of follitropin receptor signaling in nuclear protein transitions and chromatin condensation during spermatogenesis. *Biochemical and biophysical research communications*. 2003;312(3):697-701.

76. Saleh RA, Agarwal A, Sharma RK, Said TM, Sikka SC, Thomas AJ, Jr. Evaluation of nuclear DNA damage in spermatozoa from infertile men with varicocele. *Fertility and sterility*. 2003;80(6):1431-6.
77. Potts RJ, Newbury CJ, Smith G, Notarianni LJ, Jefferies TM. Sperm chromatin damage associated with male smoking. *Mutation research*. 1999;423(1-2):103-11.
78. Kunzle R, Mueller MD, Hanggi W, Birkhauser MH, Drescher H, Bersinger NA. Semen quality of male smokers and nonsmokers in infertile couples. *Fertility and sterility*. 2003;79(2):287-91.
79. Blumer CG, Fariello RM, Restelli AE, Spaine DM, Bertolla RP, Cedenho AP. Sperm nuclear DNA fragmentation and mitochondrial activity in men with varicocele. *Fertility and sterility*. 2008;90(5):1716-22.
80. Motrich RD, Mackern-Oberti JP, Maccioni M, Rivero VE. Effects of autoimmunity to the prostate on the fertility of the male rat. *Fertility and sterility*. 2009;91(5 Suppl):2273-80.
81. Nicopoullos JD, Gilling-Smith C, Almeida PA, Homa S, Norman-Taylor JQ, Ramsay JW. Sperm DNA fragmentation in subfertile men: the effect on the outcome of intracytoplasmic sperm injection and correlation with sperm variables. *BJU international*. 2008;101(12):1553-60.
82. Ribas-Maynou J, Garcia-Peiro A, Fernandez-Encinas A, Amengual MJ, Prada E, Cortes P, et al. Double stranded sperm DNA breaks, measured by Comet assay, are associated with unexplained recurrent miscarriage in couples without a female factor. *PloS one*. 2012;7(9):e44679.
83. Esbert M, Pacheco A, Vidal F, Florensa M, Riqueros M, Ballesteros A, et al. Impact of sperm DNA fragmentation on the outcome of IVF with own or donated oocytes. *Reproductive biomedicine online*. 2011;23(6):704-10.
84. Bungum M, Humaidan P, Spano M, Jepson K, Bungum L, Giwercman A. The predictive value of sperm chromatin structure assay (SCSA) parameters for the outcome of intrauterine insemination, IVF and ICSI. *Human reproduction*. 2004;19(6):1401-8.
85. Ribas-Maynou J, Garcia-Peiro A, Fernandez-Encinas A, Abad C, Amengual MJ, Prada E, et al. Comprehensive analysis of sperm DNA

fragmentation by five different assays: TUNEL assay, SCSA, SCD test and alkaline and neutral Comet assay. *Andrology*. 2013;1(5):715-22.

86. Barroso G, Morshedi M, Oehninger S. Analysis of DNA fragmentation, plasma membrane translocation of phosphatidylserine and oxidative stress in human spermatozoa. *Human reproduction*. 2000;15(6):1338-44.

87. Evenson DP, Darzynkiewicz Z, Melamed MR. Comparison of human and mouse sperm chromatin structure by flow cytometry. *Chromosoma*. 1980;78(2):225-38.

88. Fernandez JL, Muriel L, Goyanes V, Segrelles E, Gosalvez J, Enciso M, et al. Simple determination of human sperm DNA fragmentation with an improved sperm chromatin dispersion test. *Fertility and sterility*. 2005;84(4):833-42.

89. Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental cell research*. 1988;175(1):184-91.

90. Erenpreiss J, Jepson K, Giwerzman A, Tsarev I, Erenpreisa J, Spano M. Toluidine blue cytometry test for sperm DNA conformation: comparison with the flow cytometric sperm chromatin structure and TUNEL assays. *Human reproduction*. 2004;19(10):2277-82.

91. Chohan KR, Griffin JT, Lafromboise M, De Jonge CJ, Carrell DT. Comparison of chromatin assays for DNA fragmentation evaluation in human sperm. *Journal of andrology*. 2006;27(1):53-9.

92. Garcia-Peiro A, Oliver-Bonet M, Navarro J, Abad C, Guitart M, Amengual MJ, et al. Dynamics of sperm DNA fragmentation in patients carrying structurally rearranged chromosomes. *International journal of andrology*. 2011;34(6 Pt 2):e546-53.

93. Evenson DP. Sperm chromatin structure assay (SCSA(R)). *Methods in molecular biology*. 2013;927:147-64.

94. Fernandez JL, Muriel L, Goyanes V, Segrelles E, Gosalvez J, Enciso M, et al. Halosperm is an easy, available, and cost-effective alternative for determining sperm DNA fragmentation. *Fertility and sterility*. 2005;84(4):860.

95. Cyclophosphamide--an anticancer and immunosuppressive drug. *Med Lett Drugs Ther*. 1971;13(16):67-8.

96. Uldall PR, Feest TG, Morley AR, Tomlinson BE, Kerr DN. Cyclophosphamide therapy in adults with minimal-change nephrotic syndrome. *Lancet*. 1972;1(7763):1250-3.
97. Cohen JL, Jao JY. Enzymatic basis of cyclophosphamide activation by hepatic microsomes of the rat. *J Pharmacol Exp Ther*. 1970;174(2):206-10.
98. Hall AG, Tilby MJ. Mechanisms of action of, and modes of resistance to, alkylating agents used in the treatment of haematological malignancies. *Blood Rev*. 1992;6(3):163-73.
99. Balow JE, Austin HA, 3rd, Tsokos GC, Antonovych TT, Steinberg AD, Klippel JH. NIH conference. Lupus nephritis. *Ann Intern Med*. 1987;106(1):79-94.
100. Qureshi MS, Pennington JH, Goldsmith HJ, Cox PE. Cyclophosphamide therapy and sterility. *Lancet*. 1972;2(7790):1290-1.
101. Guzick DS, Overstreet JW, Factor-Litvak P, Brazil CK, Nakajima ST, Coutifaris C, et al. Sperm morphology, motility, and concentration in fertile and infertile men. *N Engl J Med*. 2001;345(19):1388-93.
102. Zini A, Kamal K, Phang D, Willis J, Jarvi K. Biologic variability of sperm DNA denaturation in infertile men. *Urology*. 2001;58(2):258-61.
103. Petri M, Orbai AM, Alarcon GS, Gordon C, Merrill JT, Fortin PR, et al. Derivation and validation of the Systemic Lupus International Collaborating Clinics classification criteria for systemic lupus erythematosus. *Arthritis and rheumatism*. 2012;64(8):2677-86.
104. Gladman DD, Ibanez D, Urowitz MB. Systemic lupus erythematosus disease activity index 2000. *The Journal of rheumatology*. 2002;29(2):288-91.
105. Gladman D, Ginzler E, Goldsmith C, Fortin P, Liang M, Urowitz M, et al. The development and initial validation of the Systemic Lupus International Collaborating Clinics/American College of Rheumatology damage index for systemic lupus erythematosus. *Arthritis and rheumatism*. 1996;39(3):363-9.
106. Prader A. Testicular size: assessment and clinical importance. *Triangle; the Sandoz journal of medical science*. 1966;7(6):240-3.
107. Dubin L, Amelar RD. Varicocele size and results of varicocelectomy in selected subfertile men with varicocele. *Fertility and sterility*. 1970;21(8):606-9.

108. World Health Organization: WHO Laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction. Cambridge: Cambridge University Press; 1999.
109. Cooper TG, Noonan E, von Eckardstein S, Auger J, Baker HW, Behre HM, et al. World Health Organization reference values for human semen characteristics. Human reproduction update. 2010;16(3):231-45.
110. Kruger TF. Atlas of Human Sperm Morphology Evaluation. first ed. London: Taylor & Francis; 2004.
111. Hughes CM, Lewis SE, McKelvey-Martin VJ, Thompson W. A comparison of baseline and induced DNA damage in human spermatozoa from fertile and infertile men, using a modified comet assay. Mol Hum Reprod. 1996;2(8):613-9.
112. Harris PA, Taylor R, Thielke R, Payne J, Gonzalez N, Conde JG. Research electronic data capture (REDCap)--a metadata-driven methodology and workflow process for providing translational research informatics support. J Biomed Inform. 2009;42(2):377-81.
113. Hippocrates, Adams F. The genuine works of Hippocrates. New York,: W. Wood and company; 1886.
114. Garrison FH. An introduction to the history of medicine : with medical chronology, suggestions for study and bibliographic data. 4th ed. Philadelphia: W.B. Saunders; 1929. 996 p. p.
115. Bacon F, George Fabyan Collection (Library of Congress). Franc. Baconis de Verulamio, Summi Angliae Cancellarij, Novum organum scientiarum. Lugd. Bat.: Apud Adrianum Wijngaerde et Franciscum Moiardum; 1645. 24 , 435, 1 p. p.
116. Descartes R. Discours de la méthode pour bien conduire sa raison et chercher la vérité dans les sciences. Paris,: Librairie de la Bibliothèque nationale; 1888. 157 p. p.
117. Irvine S, Cawood E, Richardson D, MacDonald E, Aitken J. Evidence of deteriorating semen quality in the United Kingdom: birth cohort study in 577 men in Scotland over 11 years. Bmj. 1996;312(7029):467-71.
118. 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. *Fertility and sterility*. 1996;65(5):1015-20.

119. MacLeod J, Wang Y. Male fertility potential in terms of semen quality: a review of the past, a study of the present. *Fertility and sterility*. 1979;31(2):103-16.

120. Bostofte E, Serup J, Rebbe H. Has the fertility of Danish men declined through the years in terms of semen quality? A comparison of semen qualities between 1952 and 1972. *International journal of fertility*. 1983;28(2):91-5.

121. Berling S, Wolner-Hanssen P. No evidence of deteriorating semen quality among men in infertile relationships during the last decade: a study of males from Southern Sweden. *Hum Reprod*. 1997;12(5):1002-5.

122. Sultan Sheriff D. Setting standards of male fertility I. Semen analyses in 1500 patients--a report. *Andrologia*. 1983;15(6):687-92.

123. Fisch H, Goluboff ET, Olson JH, Feldshuh J, Broder SJ, Barad DH. Semen analyses in 1,283 men from the United States over a 25-year period: no decline in quality. *Fertility and sterility*. 1996;65(5):1009-14.

124. Auger J, Kunstmann JM, Czyglik F, Jouannet P. Decline in semen quality among fertile men in Paris during the past 20 years. *The New England journal of medicine*. 1995;332(5):281-5.

125. Bujan L, Mansat A, Pontonnier F, Mieusset R. Time series analysis of sperm concentration in fertile men in Toulouse, France between 1977 and 1992. *Bmj*. 1996;312(7029):471-2.

126. Filozof C, Gonzalez C, Sereday M, Mazza C, Braguinsky J. Obesity prevalence and trends in Latin-American countries. *Obes Rev*. 2001;2(2):99-106.

127. Dearth-Wesley T, Wang H, Popkin BM. Under- and overnutrition dynamics in Chinese children and adults (1991-2004). *Eur J Clin Nutr*. 2008;62(11):1302-7.

128. Ogden CL, Carroll MD, Fryar CD, Flegal KM. Prevalence of Obesity Among Adults and Youth: United States, 2011-2014. *NCHS Data Brief*. 2015(219):1-8.

129. Rivera JA, Barquera S, Gonzalez-Cossio T, Olaiz G, Sepulveda J. Nutrition transition in Mexico and in other Latin American countries. *Nutr Rev.* 2004;62(7 Pt 2):S149-57.
130. Meldrum DR, Morris MA, Gambone JC. Obesity pandemic: causes, consequences, and solutions-but do we have the will? *Fertility and sterility.* 2017;107(4):833-9.
131. Chavarro JE, Toth TL, Wright DL, Meeker JD, Hauser R. Body mass index in relation to semen quality, sperm DNA integrity, and serum reproductive hormone levels among men attending an infertility clinic. *Fertility and sterility.* 2010;93(7):2222-31.
132. Pasquali R. Obesity and androgens: facts and perspectives. *Fertility and sterility.* 2006;85(5):1319-40.
133. Jensen TK, Andersson AM, Jorgensen N, Andersen AG, Carlsen E, Petersen JH, et al. Body mass index in relation to semen quality and reproductive hormones among 1,558 Danish men. *Fertility and sterility.* 2004;82(4):863-70.
134. Thomsen L, Humaidan P, Bungum L, Bungum M. The impact of male overweight on semen quality and outcome of assisted reproduction. *Asian journal of andrology.* 2014;16(5):749-54.
135. Bieniek JM, Kashanian JA, Deibert CM, Grober ED, Lo KC, Brannigan RE, et al. Influence of increasing body mass index on semen and reproductive hormonal parameters in a multi-institutional cohort of subfertile men. *Fertility and sterility.* 2016;106(5):1070-5.
136. Taha EA, Sayed SK, Gaber HD, Abdel Hafez HK, Ghandour N, Zahran A, et al. Does being overweight affect seminal variables in fertile men? *Reproductive biomedicine online.* 2016;33(6):703-8.
137. Leisegang K, Bouic PJ, Menkveld R, Henkel RR. Obesity is associated with increased seminal insulin and leptin alongside reduced fertility parameters in a controlled male cohort. *Reproductive biology and endocrinology : RB&E.* 2014;12:34.
138. Lu JC, Jing J, Chen L, Ge YF, Feng RX, Liang YJ, et al. Analysis of human sperm DNA fragmentation index (DFI) related factors: a report of 1010

subfertile men in China. *Reproductive biology and endocrinology* : RB&E. 2018;16(1):23.

139. Oliveira JBA, Petersen CG, Mauri AL, Vagnini LD, Renzi A, Petersen B, et al. Association between body mass index and sperm quality and sperm DNA integrity. A large population study. *Andrologia*. 2018;50(3).

140. Rybar R, Kopecka V, Prinosilova P, Markova P, Rubes J. Male obesity and age in relationship to semen parameters and sperm chromatin integrity. *Andrologia*. 2011;43(4):286-91.

141. Dunson DB, Baird DD, Colombo B. Increased infertility with age in men and women. *Obstet Gynecol*. 2004;103(1):51-6.

142. Vivas-Acevedo G, Lozano JR, Camejo MI. Effect of varicocele grade and age on seminal parameters. *Urol Int*. 2010;85(2):194-9.

143. Krause W, Habermann B. No change with age in semen volume, sperm count and sperm motility in individual men consulting an infertility clinic. *Urol Int*. 2000;64(3):139-42.

144. Mukhopadhyay D, Varghese AC, Pal M, Banerjee SK, Bhattacharyya AK, Sharma RK, et al. 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. *Fertility and sterility*. 2010;93(7):2247-54.

145. Horta F, Madariaga M, Garcia A, Hartel S, Smith R. [Association of age with sperm DNA fragmentation]. *Rev Med Chil*. 2011;139(3):306-12.

146. Cocuzza M, Athayde KS, Agarwal A, Sharma R, Pagani R, Lucon AM, et al. Age-related increase of reactive oxygen species in neat semen in healthy fertile men. *Urology*. 2008;71(3):490-4.

147. Humm KC, Sakkas D. Role of increased male age in IVF and egg donation: is sperm DNA fragmentation responsible? *Fertility and sterility*. 2013;99(1):30-6.

148. Varshini J, Srinag BS, Kalthur G, Krishnamurthy H, Kumar P, Rao SB, et al. Poor sperm quality and advancing age are associated with increased sperm DNA damage in infertile men. *Andrologia*. 2012;44 Suppl 1:642-9.

149. Belloc S, Benkhalifa M, Cohen-Bacrie M, Dalleac A, Amar E, Zini A. Sperm deoxyribonucleic acid damage in normozoospermic men is related to age and sperm progressive motility. *Fertility and sterility*. 2014;101(6):1588-93.
150. Das M, Al-Hathal N, San-Gabriel M, Phillips S, Kadoch IJ, Bissonnette F, et al. High prevalence of isolated sperm DNA damage in infertile men with advanced paternal age. *Journal of assisted reproduction and genetics*. 2013;30(6):843-8.
151. Clarke BG. Incidence of varicocele in normal men and among men of different ages. *Jama*. 1966;198(10):1121-2.
152. Gorelick JI, Goldstein M. Loss of fertility in men with varicocele. *Fertility and sterility*. 1993;59(3):613-6.
153. Witt MA, Lipshultz LI. Varicocele: a progressive or static lesion? *Urology*. 1993;42(5):541-3.
154. Tiseo BC, Esteves SC, Cocuzza MS. Summary evidence on the effects of varicocele treatment to improve natural fertility in subfertile men. *Asian journal of andrology*. 2016;18(2):239-45.
155. Agarwal A, Deepinder F, Cocuzza M, Agarwal R, Short RA, Sabanegh E, et al. Efficacy of varicocelectomy in improving semen parameters: new meta-analytical approach. *Urology*. 2007;70(3):532-8.
156. Baazeem A, Belzile E, Ciampi A, Dohle G, Jarvi K, Salonia A, et al. Varicocele and male factor infertility treatment: a new meta-analysis and review of the role of varicocele repair. *European urology*. 2011;60(4):796-808.
157. Schauer I, Madersbacher S, Jost R, Hubner WA, Imhof M. The impact of varicocelectomy on sperm parameters: a meta-analysis. *The Journal of urology*. 2012;187(5):1540-7.
158. Zini A, Dohle G. Are varicoceles associated with increased deoxyribonucleic acid fragmentation? *Fertility and sterility*. 2011;96(6):1283-7.
159. Esteves SC, Gosalvez J, Lopez-Fernandez C, Nunez-Calonge R, Caballero P, Agarwal A, et al. Diagnostic accuracy of sperm DNA degradation index (DDSi) as a potential noninvasive biomarker to identify men with varicocele-associated infertility. *International urology and nephrology*. 2015;47(9):1471-7.

160. Donnelly ET, O'Connell M, McClure N, Lewis SE. Differences in nuclear DNA fragmentation and mitochondrial integrity of semen and prepared human spermatozoa. *Human reproduction*. 2000;15(7):1552-61.
161. Farhat J, Farhat SC, Braga AL, Cocuzza M, Borba EF, Bonfa E, et al. Ozone decreases sperm quality in systemic lupus erythematosus patients. *Rev Bras Reumatol Engl Ed*. 2016;56(3):212-9.
162. Silva CA, Bonfa E, Ostensen M. Maintenance of fertility in patients with rheumatic diseases needing antiinflammatory and immunosuppressive drugs. *Arthritis Care Res (Hoboken)*. 2010;62(12):1682-90.
163. Bisht S, Dada R. Oxidative stress: Major executioner in disease pathology, role in sperm DNA damage and preventive strategies. *Front Biosci (Schol Ed)*. 2017;9:420-47.
164. Aydemir B, Onaran I, Kiziler AR, Alici B, Akyolcu MC. Increased oxidative damage of sperm and seminal plasma in men with idiopathic infertility is higher in patients with glutathione S-transferase Mu-1 null genotype. *Asian journal of andrology*. 2007;9(1):108-15.
165. Irvine DS, Twigg JP, Gordon EL, Fulton N, Milne PA, Aitken RJ. DNA integrity in human spermatozoa: relationships with semen quality. *Journal of andrology*. 2000;21(1):33-44.
166. Saleh RA, Agarwal A, Nada EA, El-Tonsy MH, Sharma RK, Meyer A, et al. Negative effects of increased sperm DNA damage in relation to seminal oxidative stress in men with idiopathic and male factor infertility. *Fertility and sterility*. 2003;79 Suppl 3:1597-605.
167. Mayorga-Torres BJ, Cardona-Maya W, Cadavid A, Camargo M. [Evaluation of sperm functional parameters in normozoospermic infertile individuals]. *Actas urologicas espanolas*. 2013;37(4):221-7.
168. Feng PH, George CR, Evans RA, Murkin GE, Spicer E, Thomas BS, et al. Cyclophosphamide and infertility. *Lancet*. 1972;1(7755):840-2.
169. Bogdanovic R, Cvoric A, Banicevic M, Zdravkovic D, Nikolic V, Ognjanovic M. [Delayed effect of cyclophosphamide on testicular function after treatment of nephrotic syndrome in childhood]. *Srp Arh Celok Lek*. 1990;118(5-6):235-42.

170. Watson AR, Rance CP, Bain J. Long term effects of cyclophosphamide on testicular function. *Br Med J (Clin Res Ed)*. 1985;291(6507):1457-60.
171. Vermeulen A, Verdonck G. Representativeness of a single point plasma testosterone level for the long term hormonal milieu in men. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 1992;74(4):939-42.
172. Andersson AM, Carlsen E, Petersen JH, Skakkebaek NE. Variation in levels of serum inhibin B, testosterone, estradiol, luteinizing hormone, follicle-stimulating hormone, and sex hormone-binding globulin in monthly samples from healthy men during a 17-month period: possible effects of seasons. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2003;88(2):932-7.
173. Stokes-Riner A, Thurston SW, Brazil C, Guzick D, Liu F, Overstreet JW, et al. One semen sample or 2? Insights from a study of fertile men. *Journal of andrology*. 2007;28(5):638-43.
174. Uhler ML, Zinaman MJ, Brown CC, Clegg ED. Relationship between sperm characteristics and hormonal parameters in normal couples. *Fertility and sterility*. 2003;79 Suppl 3:1535-42.
175. Silva CA, Cocuzza M, Carvalho JF, Bonfa E. Diagnosis and classification of autoimmune orchitis. *Autoimmun Rev*. 2014;13(4-5):431-4.
176. Somers EC, Marder W, Cagnoli P, Lewis EE, DeGuire P, Gordon C, et al. Population-based incidence and prevalence of systemic lupus erythematosus: the Michigan Lupus Epidemiology and Surveillance program. *Arthritis Rheumatol*. 2014;66(2):369-78.
177. Lim SS, Bayakly AR, Helmick CG, Gordon C, Easley KA, Drenkard C. The incidence and prevalence of systemic lupus erythematosus, 2002-2004: The Georgia Lupus Registry. *Arthritis Rheumatol*. 2014;66(2):357-68.