



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

SAMYRA SIQUEIRA

PARÂMETROS SEMINAIS DOS HOMENS BRASILEIROS NOS ÚLTIMOS 29 ANOS

Seminal parameters among Brazilian men over the past 29 years

CAMPINAS

2019

SAMYRA SIQUEIRA

PARÂMETROS SEMINAIS DOS HOMENS BRASILEIROS NOS ÚLTIMOS 29 ANOS

Seminal parameters among Brazilian men over the past 29 years

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tocoginecologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do Título de Mestra em Ciências da Saúde, área de concentração em Fisiopatologia Ginecológica

Dissertation submitted to the Department of Post-Graduate Studies in Obstetrics and Gynecology, Faculty of Medical Sciences, University of Campinas to obtain the master degree on Health Sciences, area of Gynecology Pathophysiology

ORIENTADOR: PROF. DR. LUIZ FRANCISCO CINTRA BACCARO

COORIENTADOR: PROF. DR. LUIS GUILLERMO BAHAMONDES

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO
FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELA
ALUNA SAMYRA SIQUEIRA, E ORIENTADA PELO
DR. LUIZ FRANCISCO CINTRA BACCARO E COORIENTADA PELO
PROF. DR. LUIS GUILLERMO BAHAMONDES

CAMPINAS

2019

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

Si75p Siqueira, Samyra, 1988-
Parâmetros seminais dos homens brasileiros nos últimos 29 anos / Samyra Siqueira. – Campinas, SP : [s.n.], 2019.

Orientador: Luiz Francisco Cintra Baccaro.
Coorientador: Luis Guillermo Bahamondes.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Infertilidade masculina. 2. Contagem de espermatozoides. 3. Espermatozoides. 4. Teratozoospermia. 5. Oligospermia. 6. Infertilidade. I. Baccaro, Luiz Francisco Cintra, 1980-. II. Bahamondes, Luis Guillermo, 1946-. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Seminal parameters among brazilian men over the past 29 years

Palavras-chave em inglês:

Male infertility

Sperm count

Spermatozoa

Teratozoospermia

Oligospermia

Infertility

Área de concentração: Fisiopatologia Ginecológica

Titulação: Mestra em Ciências da Saúde

Banca examinadora:

Luiz Francisco Cintra Baccaro [Orientador]

Ricardo Pimenta Bertolla

Cassia Raquel Teatin Juliato

Data de defesa: 13-12-2019

Programa de Pós-Graduação: Tocoginecologia

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0003-3126-7712>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/3113430181402401>

BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE MESTRADO

SAMYRA SIQUEIRA

ORIENTADOR: PROF. DR. LUIZ FRANCISCO CINTRA BACCARO

COORDINADOR: PROF. DR. LUIS GUILLERMO BAHAMONDES

MEMBROS:

1. PROF. DR. LUIZ FRANCISCO CINTRA BACCARO

2. PROF. DR. RICARDO PIMENTA BERTOLLA

3. PROFA. DRA. CASSIA RAQUEL TEATIN JULIATO

Programa de Pós-Graduação em Tocoginecologia da Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas

A ata de defesa com as respectivas assinaturas dos membros da banca examinadora encontra-se no processo de vida acadêmica do aluno.

DATA DA DEFESA: 13/12/2019

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a todos os cientistas e acadêmicos, que
assim como eu, acreditam que a educação é a base fundamental
para uma sociedade menos desigual
e mais justa.

AGRADECIMENTOS

Meu agradecimento inicial será para toda minha família, por todo o amor e por terem me ensinado todos os valores que tenho hoje, tanto na vida pessoal quanto profissional.

Obrigada mãe, pai, meu irmão Juninho, minha avó D. Seda, minhas tias que sempre enviam mensagens e meu marido Rafael por serem sempre uma fonte de inspiração e incentivo para mim.

Agradeço a Deus por todas as bênçãos já alcançadas em minha vida e por mais essa conquista.

Agradeço minhas amigas da faculdade por estarmos juntas e unidas após tantos anos e aqueles amigos que pelas circunstâncias se tornaram mais próximos e aqueles que se afastaram. Acredito que todos que passam por nossas vidas não passam em vão, deixam algum ensinamento.

Agradeço aos meu orientadores Prof. Dr. Luiz Francisco Cintra Baccaro e Prof. Dr. Luis Guillermo Bahamondes pelos ensinamentos, experiência trocadas, incentivos e sobretudo por ser acadêmicos tão inspiradores. E não poderia deixar de agradecer a Adriana Campos por toda ajuda e disponibilidade que sempre teve comigo e ao meu projeto.

Por mim, agradeço a minha turma de mestrado pelos dias alegres de aulas, pelas conversas nos corredores e pelas experiências trocadas por 2 anos. Um brinde a este ciclo encerrado com sucesso por todos nós!

RESUMO

Introdução: A infertilidade conjugal é reconhecida pela Organização Mundial da Saúde como doença e um problema de saúde pública. O fator masculino pode contribuir com aproximadamente 40% dos casos de infertilidade. Embora estudos sugiram um declínio na qualidade seminal em homens ao redor do mundo nos últimos anos, ainda há dúvidas se esse fenômeno realmente vem ocorrendo. Com isso, nosso objetivo foi investigar o comportamento dos parâmetros seminais de homens submetidos a investigação para infertilidade conjugal nos últimos 29 anos. **Métodos:** foi realizada uma análise retrospectiva dos espermogramas realizados no Laboratório de Reprodução Humana do Hospital da Mulher Prof. Dr. José Aristodemo Pinotti – CAISM/UNICAMP entre os anos de 1989 e 2018. Foi construído um banco de dados com a data de realização do exame, a idade do homem à coleta e com os diferentes parâmetros da primeira amostra produzida por cada homem em investigação por infertilidade conjugal. As variáveis dependentes analisadas foram o número total de espermatozoides móveis progressivos, a porcentagem de espermatozoides com morfologia normal e a concentração de espermatozoides após o processamento seminal. O ano de coleta do espermograma foi considerado como variável independente. A idade do homem na data da coleta do exame foi considerada como variável de controle e categorizada nas seguintes faixas etárias: <30, 30-39 e > 40 anos. A análise estatística foi realizada através de regressão linear para os valores de mediana devido à distribuição não normal das variáveis. Foram construídos diferentes modelos de regressão para o grupo total de amostras e para os grupos categorizados por faixas etárias. O nível de significância foi estabelecido em 5%. **Resultados:** foram analisadas 11472 amostras de sêmen produzidas por 11472 homens (primeira amostra produzida no laboratório) entre os períodos de 03/01/1989 e

29/06/2018. A média de idade dos homens foi de 32,36 ($\pm 6,49$) anos. Entre eles, 34,86% (3999) tinham menos de 30 anos, 52,84% (6062) tinham entre 30 e 39 anos e 12,29% (1411) tinham mais de 40 anos. Em relação ao número total de espermatozoides móveis progressivos verificamos tendência significativa de redução do valor mediano ao longo dos anos no grupo geral (redução de 1,93 milhão/ano; $p < 0,01$) e nas três faixas etárias estudadas separadamente ($p < 0,01$ para as três faixas etárias). Quanto à porcentagem de espermatozoides com morfologia normal verificamos tendência significativa de redução do valor mediano ao longo dos anos no grupo geral (redução de 0,84% ao ano; $p < 0,01$) e nas três faixas etárias estudadas ($p < 0,01$ para as três faixas etárias). Quanto à concentração de espermatozoides após o processamento seminal observamos tendência significativa de redução no valor mediano no grupo geral (redução de 0,14 milhões/mL ao ano; $p < 0,01$) e nas faixas etárias entre 30 e 39 anos ($p < 0,01$) e com mais de 40 anos ($p < 0,01$). **Conclusão:** entre 1989 e 2018 houve declínio no número total de espermatozoides móveis progressivos, na porcentagem de espermatozoides com morfologia normal e na concentração de espermatozoides após processamento seminal em homens da região sudeste do Brasil submetidos a investigação por infertilidade conjugal.

Palavra-chave: Infertilidade masculina; Contagem de Espermatozoides; Espermatozoides; Teratozoospermia; Oligospermia; Infertilidade

ABSTRACT

Introduction: Infertility is recognized by the World Health Organization as a disease and a public health problem. A male factor can be responsible for approximately 40% of infertility cases. Although some studies suggest a decline in seminal quality in men around the world, there is still some doubt as to whether this phenomenon has really been occurring. Thus, our objective was to investigate the behavior of seminal parameters of men submitted to infertility investigation in the last 29 years. **Methods:** we did a retrospective analysis of the spermograms performed at the Human Reproduction Laboratory of UNICAMP Women's Hospital between 1989 and 2018. A database was constructed with the date of the exam, the age of the man at sample collection and the different parameters of the sample. The dependent variables analyzed were the total number of progressive motile sperm, the percentage of sperm with normal morphology and the sperm concentration after seminal processing. The year of sperm collection was considered as an independent variable. The age of the man at the time of exam collection was considered as a control variable and categorized into the following age groups: <30, 30-39 and > 40 years. Statistical analysis was performed by linear regression of the median values due to non-normal distribution of variables. Different regression models were constructed for the total sample group and for the groups categorized by age. The significance level was set at 5%. **Results:** 11472 semen samples produced by 11472 men (first sample produced in the laboratory) between the periods of 03/01/1989 and 29/06/2018 were analyzed. The mean age of men was 32.36 (\pm 6.49) years. Among them, 34.86% (3999) were under 30 years old, 52.84% (6062) were between 30 and 39 years old and 12.29% (1411) were over 40 years old. Regarding the total number of progressive motile sperm, we observed a significant decrease in the median values over the years in

the total group (reduction of 1.93 million / year; $p < 0.01$) and in the three age groups studied separately ($p < 0.01$ for the three age groups). Regarding the percentage of sperm with normal morphology, we observed a significant decrease in the median values over the years in the total group (reduction of 0.84% per year; $p < 0.01$) and in the three age groups studied separately ($p < 0.01$ for the three age groups). Regarding sperm concentration after seminal processing we observed a significant reduction in median values in the total group (reduction of 0.14 million/mL per year; $p < 0.01$) and in the age groups between 30 and 39 years ($p < 0.01$) and older than 40 years ($p < 0.01$).

Conclusion: between 1989 and 2018 there was a decline in the total number of progressive motile sperm, the percentage of sperm with normal morphology, and in the sperm concentration after seminal processing in men from southeastern Brazil undergoing infertility investigation.

Key-words: Male infertility; Sperm Count; Spermatozoa; Teratozoospermia; Oligospermia; Infertility

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

OMS	- Organização Mundial da Saúde
IUI	- Inseminação Intrauterina
FIV	- Fertilização <i>in vitro</i>
ICSI	- Injeção intracitoplasmática de espermatozoides
MESA	- Aspiração microcirúrgica de espermatozoides do epidídimo
TESE	- Extração de espermatozoides do testículo
ROS	- Espécie reativa de oxigênio
MENA	- Região do Oriente Médio e Norte da África
LRH	- Laboratório de Reprodução Humana
TMSC	- Concentração total de espermatozoides móveis progressivos
RF-EMR	- Radiação eletromagnética de radiofrequência

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	13
2. OBJETIVOS.....	22
2.1. Objetivo geral.....	22
2.2. Objetivos específicos.....	22
3. METODOLOGIA	23
4. RESULTADOS	29
5. DISCUSSÃO GERAL	55
6. CONCLUSÃO	61
7. REFERÊNCIAS	62
8. ANEXOS.....	71
Anexo 1 - Comissão de Pesquisa do CAISM	71
Anexo 2 – Aprovação do projeto no CEP – UNICAMP	73

1. INTRODUÇÃO

A infertilidade afeta mais de 186 milhões de pessoas no mundo, sendo que a maioria delas vive em países em desenvolvimento (1). A média mensal das taxas de gravidez em humanos é de 20% (2) e estudos descrevem que 80% dos casais que não apresentam nenhum problema aparente que impeça a concepção, engravida após 6 meses de tentativa (3). Casais são considerados inférteis quando não obtêm uma gestação bem sucedida em um período de 12 meses de relações sexuais regulares e sem uso de anticoncepcionais de qualquer natureza (4).

A infertilidade conjugal é reconhecida pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como doença e um problema de saúde pública. Pode provocar consequências físicas e psicológicas, tanto para as mulheres quanto para os homens, como sofrimento psicológico e estigmatização social (5). Estimativas indicam que entre 52,6 e 72,4 milhões de casais ao redor do mundo irão procurar algum tipo de intervenção médica a fim de engravidar (6,7).

Para casais que desejam uma gestação e não obtêm êxito após 12 meses de tentativas, indica-se iniciar investigação da causa da infertilidade conjugal. Diversas condições pessoais e doenças podem ser responsáveis pela diminuição na fertilidade de um casal. De maneira simplificada podem ser classificadas em: baixa reserva ovariana, disfunção ovulatória, fatores relacionados à anatomia uterina, fatores tuboperitoniais, fatores masculinos que alteram a concentração, motilidade e morfologia dos espermatozoides, e infertilidade sem causa aparente (8).

As técnicas de reprodução assistida são alternativas de tratamento para casais inférteis, podendo englobar procedimentos de baixa ou de alta complexidade. Uma das técnicas de baixa complexidade é a inseminação intrauterina (IIU) que consiste, de forma

simplificada, em separar os espermatozoides com maior mobilidade através de uma lavagem simples do sêmen, ou através de métodos mais complexos, como o swim-up ou gradiente de concentração, e depositá-los através de um cateter no interior da cavidade uterina (9). As terapias de alta complexidade envolvem a manipulação de gametas *in vitro*. Na fertilização *in vitro* (FIV) convencional os melhores espermatozoides selecionados após processamento do sêmen são colocados em contato com os ovócitos *in vitro* para que ocorra a fecundação de forma espontânea (10). Nos casos em que a amostra seminal não puder ser obtida através da ejaculação, os espermatozoides podem ser recuperados cirurgicamente pelo epidídimo (MESA), ou extraídos diretamente dos testículos (TESE). Nesses casos, pode ser necessário a injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI), que consiste na injeção de um único espermatozoide no interior do ovócito. Se a fecundação for bem sucedida é esperado o desenvolvimento celular em cultura e o embrião formado será transferido para o útero materno (10).

A avaliação de um possível fator masculino de infertilidade é fundamental. Estima-se que ele seja o único responsável em aproximadamente 20% dos casos de infertilidade e que contribua em cerca de 30-40% deles (11). Sugere-se que a investigação seja realizada simultaneamente à investigação dos fatores femininos de infertilidade, porém, em pelo menos 18% dos casos isto pode não acontecer (12). A análise seminal é essencial, podendo incluir avaliação física, hormonal e funcional, além de análises genéticas (13).

A espermatogênese é o processo que envolve a formação dos espermatozoides nos túbulos seminíferos dentro do testículo. Nos testículos existem três tipos celulares: células germinativas (células que se dividem e amadurecem para a formação do espermatozoide); células de Sertoli (que auxiliam na espermatogênese); e as células

intersticiais de Leydig (responsáveis pela produção da testosterona) (14). A espermatogênese ocorre de forma contínua com as espermatogônias se proliferando por mitose. No processo da meiose, estão envolvidas duas divisões celulares, em duas etapas: espermatócitos e espermatídes. As espermatídes possuem apenas uma cópia de cada cromossomo, que após a meiose são as mesmas que se diferenciam em espermatozoides alongados com cauda no processo da espermiogênese. Este processo dura em média 72 a 74 dias (14,15).

Morfológicamente o espermatozoide é constituído por cabeça (onde se localiza o núcleo com as informações genéticas, e o acrossomo, um lisossomo especializado com enzimas necessárias para a penetração do ovócito), por uma parte média, onde se localizam as mitocôndrias, que fornecem a energia necessária para movimentação da cauda (flagelo) que cresce a partir de um dos centríolos (16). Segundo estudos recentes, o flagelo possui estruturas acessórias que reforçam sua motilidade ao passar pela viscosidade aumentada do muco cervical (17).

O sêmen liberado no momento da ejaculação é composto por um conjunto de secreções dos testículos e epidídimo, contendo espermatozoides em suspensão, juntamente com as secreções da próstata, vesículas seminais e glândulas bulbouretrais. O espermograma consiste na análise sistemática destes componentes e é o exame de escolha para a avaliação inicial de um possível fator masculino de infertilidade (18). O desenvolvimento das primeiras técnicas para análise seminal se deu no início do século XX, e desde então elas assumiram um papel importante na rotina laboratorial para investigação masculina (19). Em 1950, MacLeod e colaboradores sugeriram os primeiros valores de referência para a contagem de espermatozoides na tentativa de auxiliar os médicos a diferenciarem pacientes férteis de inférteis (valores superiores a $20 \times 10^6/\text{mL}$

para a concentração e superiores a 100×10^6 para a contagem total de espermatozoides) (19). A crescente necessidade de uma interpretação mais consistente dos resultados dos exames foi reconhecida pela OMS em seu primeiro manual em 1980 (20). A OMS publicou atualizações dos seus manuais em 1987 (21), 1992 (22), 1999 (23) e por último em 2010 (24), sendo que esta última é a mais abrangente de todas as versões (25).

O material para realização do espermograma geralmente é colhido por masturbação em frasco estéril. Sugere-se que o período de abstinência sexual não ultrapasse 5 dias (24). Os resultados da análise seminal de um mesmo indivíduo podem apresentar alto grau de variabilidade. Recomenda-se que sejam feitas pelo menos duas coletas em um intervalo de 3 meses, para se “traçar” um perfil do paciente, entretanto, este tempo de espera pode aumentar a ansiedade do casal (26). Na amostra coletada são avaliados parâmetros macroscópicos como volume, viscosidade e pH, além de parâmetros microscópicos como a concentração de espermatozoides por mililitro do ejaculado, grau de motilidade dos espermatozoides, vitalidade e morfologia (24).

Os valores de referência do manual da OMS de 2010 foram estabelecidos a partir da análise do sêmen de 1953 homens, de cinco estudos em três continentes. Todos os homens incluídos nos estudos tiveram suas parceiras grávidas em 12 meses, comprovando sua fertilidade (27). De maneira diferente, os valores de referência dos manuais anteriores haviam sido baseados na experiência clínica de investigadores que estudavam populações masculinas saudáveis (28). A edição de 2010 utilizou pela primeira vez os conceitos de “percentil” e “intervalo de confiança”. Segundo o último manual da OMS os valores considerados normais na amostra de sêmen são: volume $\geq 1,5\text{mL}$; concentração de espermatozoides ≥ 15 milhões/mL; número total de espermatozoides ≥ 39 milhões; porcentagem de espermatozoides com motilidade

progressiva $\geq 32\%$; porcentagem de espermatozoides com motilidade total $\geq 40\%$; porcentagem de espermatozoides vivos na amostra (vitalidade) $\geq 58\%$ e porcentagem de espermatozoides com morfologia normal $\geq 4\%$ (24). Estes valores de referência diferem sensivelmente dos valores das edições anteriores. Muitos homens classificados como portadores de sêmen anormal de acordo com a edição de 1999 seriam classificados como normais considerando-se a edição de 2010 (29). Mesmo assim, apesar do espermograma ser fundamental na propedêutica do fator masculino, seus resultados podem não prever com exatidão o potencial de fertilidade. Homens com resultados considerados alterados podem ser capazes de conceber, bem como homens com resultados dentro dos padrões da normalidade podem apresentar infertilidade (12).

Com o passar do tempo e o avanço das investigações sobre a infertilidade masculina, outros parâmetros seminais vêm sendo descritos e algumas técnicas têm sido desenvolvidas para auxiliar na investigação da infertilidade masculina (30). A preocupação com a integridade do DNA espermático, morfologia seminal sobre alta ampliação, seleção por birrefringência ou até mesmo por ácido hialurônico são alguns dos avanços na seleção espermática (31). Preocupações com as ROS também ajudam a compor os avanços das investigações da infertilidade masculina (30, 32). Os espermatozoides são sensíveis aos efeitos do estresse oxidativo, pois as células germinativas, de uma forma progressiva, podem perder a capacidade de reparar os danos no DNA, prejudicando a contribuição genética e epigenética paterna no desenvolvimento embrionário (33).

Além da avaliação dos parâmetros no sêmen, as técnicas para recuperar e separar os espermatozoides funcionalmente competentes são de grande importância nas técnicas de reprodução assistida (24). As técnicas de processamento seminal podem

eliminar espécies reativas de oxigênio (ROS), levando a menor dano ao acrossomo, com a recuperação de espermatozoides móveis e funcionalmente competentes, trazendo melhores resultados para as terapias de reprodução assistida (34).

Três métodos principais podem ser utilizados para o processamento seminal (24). A lavagem simples é a técnica mais barata e menos complexa. Consiste em fazer duas lavagens no sêmen seguidas de centrifugação, sendo sugerida para homens com alterações mais sutis dos parâmetros seminais. A técnica do gradiente descontínuo de densidade consiste na separação dos componentes seminais baseado em duas densidades (24). Para a realização desta técnica o laboratório deve ser equipado com materiais e meios de cultura específicos, aumentando assim o custo do tratamento. Por outro lado, esta técnica possivelmente apresenta melhores resultados pois aumenta as chances de obtenção de um número maior de espermatozoides de boa qualidade funcional (35). O terceiro método de processamento é o *swim-up*, onde a amostra seminal passa por dois ciclos de lavagem e centrifugação, sendo mantida inclinada a 45° durante 1 hora após a adição de meio de cultura ao pellet formado. Uma alta porcentagem de espermatozoides móveis e morfolologicamente normais pode ser obtida através desta técnica (36).

Com a problemática da infertilidade conjugal em evidência no meio acadêmico e na mídia leiga, o questionamento sobre tendências temporais de qualidade seminal tem recebido destaque. Em 1992, uma revisão sistemática com metanálise incluindo 61 estudos concluiu que havia ocorrido uma queda na qualidade do sêmen de homens ao redor do mundo. A concentração média de espermatozoides, que era de 113 milhões/mL em 1940, passou a ser de 66 milhões/mL em 1990, correspondendo a uma queda de

aproximadamente 50%. Este artigo foi muito comentado na mídia leiga e citado por mais de 1000 artigos científicos (37).

Nos últimos anos vários outros autores têm relatado queda da qualidade seminal ao redor do mundo. Na região do Oriente Médio e Norte da África, uma investigação foi realizada com 13892 homens inférteis durante 4 anos, concluindo que parâmetros seminais como motilidade, morfologia normal e número total de espermatozoides, eram significativamente menores em pacientes dessa região do planeta (38). Um estudo publicado em 2017 concluiu que houve um declínio na qualidade do sêmen de 30636 jovens chineses no período de 2001 a 2015. Os autores demonstraram queda em parâmetros como motilidade progressiva, morfologia normal, número total e concentração de espermatozoides (39).

Após relatarem uma diminuição média de 57% na concentração espermática ao redor do mundo nos últimos 35 anos e um declínio de 32,5% na mesma variável da população europeia nos últimos 50 anos (40,41), Sengupta e colaboradores relataram uma diminuição de 72,6% na concentração seminal da população africana entre os anos de 1965 e 2015, destacando que a principal preocupação é o fato de que a média de concentração de espermatozoides no último ano do estudo (20,38 milhões de espermatozoides/mL) está muito próxima aos valores de referência da OMS (15 milhões de espermatozoides/mL) (42).

Na Nova Zelândia, autores realizaram um estudo retrospectivo com 975 doadores de sêmen entre 1987 e 2007, demonstrando que a concentração média de espermatozoides caiu de 110 milhões/ml em 1987 para 50 milhões/ml em 2007 (redução média de 2,5% ao ano). Além disso, o volume médio de sêmen também caiu significativamente de 3,7 mL para 3,3 mL (43).

Uma publicação feita nos Estados Unidos avaliou amostras seminais dos parceiros de 512 mulheres grávidas recrutadas em clínicas de pré-natal nas cidades de Los Angeles, Minneapolis, Columbia e Nova Iorque entre os anos de 1999 e 2001, encontrando padrões diferentes dos parâmetros seminais em todas estas cidades, sugerindo que a concentração e a motilidade espermática estariam reduzidas em áreas rurais e agrícolas (44). Recentemente, um estudo de revisão e metanálise relatou um declínio de aproximadamente 50-60% na concentração e número total de espermatozoides entre os anos de 1973 e 2011 entre homens na América do Norte, Europa, Austrália e Nova Zelândia (45).

Mais especificamente no Brasil, em 2010 foram publicados os resultados das análises seminais de doadores de sêmen na cidade de São Paulo entre os anos de 1992 e 2003. No estudo foram incluídos 182 doadores de um único banco de sêmen com idade média de 30,8 anos. Os autores encontraram uma queda na concentração e na porcentagem de espermatozoides morfolologicamente normais no período analisado (46). No ano de 2015, pesquisadores publicaram um estudo com 2300 amostras seminais, onde 764 amostras foram analisadas no período de 2000 a 2002 e 1536 amostras entre os anos de 2010 e 2012. Entre os dois períodos analisados foi observado uma queda na concentração de espermatozoides, de 61,7 milhões/mL para 26,7 milhões/mL e uma queda na porcentagem de espermatozoides morfolologicamente normais, que passou de 4,6% para 2,7%. O estudo também relatou um aumento significativo na porcentagem de homens com oligozoospermia e azoospermia (47).

As possíveis causas de uma possível queda da qualidade seminal são motivo de discussão. Estudos sugerem que alguns hábitos de vida como tabagismo (48,49), consumo excessivo de café (50) e de álcool (51), além de características pessoais como

a obesidade (52) poderiam influenciar negativamente a produção de espermatozoides. Outra teoria é a de que algumas substâncias com efeitos semelhantes ao estrogênio poderiam agir como “disruptores endócrinos”, prejudicando a função testicular de indivíduos do sexo masculino ainda em seu desenvolvimento embrionário. Agentes químicos e poluentes ambientais poderiam ter esse tipo de ação, levando à síndrome disgenética testicular, que além de um declínio da qualidade seminal, aumentaria também o risco de câncer de testículo, hipospádia e criptorquidia (53,54).

Apesar de muitos estudos relatarem queda na qualidade seminal de homens ao redor do mundo, alguns de seus aspectos metodológicos são criticados, como a grande variabilidade de métodos e protocolos usados para a coleta do sêmen, ausência de controle de período de abstinência e a não inclusão em algumas revisões de alguns artigos que não mostraram queda nos parâmetros seminais (55). Com o objetivo de investigar o comportamento dos parâmetros seminais de homens brasileiros submetidos a investigação para infertilidade conjugal entre os anos de 1989 até 2018 realizamos um estudo retrospectivo na Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Avaliar a influência do ano de coleta do exame de espermograma sobre os parâmetros seminais de homens brasileiros investigados por infertilidade conjugal no período de 1989 a 2018.

2.2. Objetivos específicos

- Descrever o número total de espermatozoides móveis progressivos em homens investigados por infertilidade conjugal no período de 1989 a 2018 e comparar segundo o ano de realização do exame e a idade do homem.
- Descrever a porcentagem de espermatozoides com morfologia normal em homens investigados por infertilidade conjugal no período de 1989 a 2018 e comparar segundo o ano de realização do exame e a idade do homem.
- Descrever a concentração de espermatozoides após processamento seminal por método de *swim-up* em homens investigados por infertilidade conjugal no período de 1989 a 2018 e comparar segundo o ano de realização do exame e a idade do homem.

3. METODOLOGIA

O Laboratório de Reprodução Humana (LRH) do Hospital da Mulher Prof. Dr. José Aristodemo Pinotti – CAISM/UNICAMP realiza o exame de espermograma desde 1989, e todos os resultados encontrados a partir deste exame são repassados em um sistema informatizado denominado “Controle de Exames Laboratoriais”, atualmente em sua versão 6.16 de 13/11/2013. Este é um sistema que permite a exportação de todos os dados arquivados para planilhas do programa Microsoft Excel. Este estudo consiste em uma análise retrospectiva dos espermogramas realizados no LRH entre os períodos de 03/01/1989 e 29/06/2018.

Para este estudo, a população analisada era composta por todos os parceiros masculinos de casais admitidos no ambulatório da UNICAMP para investigação de infertilidade conjugal. Os casais deveriam apresentar falha em conseguir uma gestação após um período de 12 meses ou mais com relações sexuais regulares e sem uso de qualquer método contraceptivo. Após a exportação de todos os dados dos espermogramas durante este período, um banco de dados com um total de 29487 amostras de sêmen produzidas por 11472 homens foi elaborado. Para o presente estudo, apenas a primeira amostra produzida por cada homem foi analisada (11472). Este banco de dados foi composto por diferentes parâmetros do espermograma além da data de realização do exame e da idade do homem na data da coleta da amostra. Também havia dados de 3972 amostras de processamento seminal realizado através da técnica de *swim-up* para avaliação da possibilidade de uma futura inseminação intrauterina. Por se tratar de uma análise retrospectiva, não estavam disponíveis dados clínicos e sociodemográficos como raça, escolaridade e hábitos pessoais. O presente estudo foi

aprovado no Comitê de Ética em Pesquisa da UNICAMP sob o número CAAE 59911516.5.0000.5404.

Análise seminal

Os homens que iriam realizar o exame de espermograma eram orientados no momento do agendamento para manter a abstinência sexual por um período entre 3 a 5 dias antes da data da coleta (21-24). As coletas eram realizadas em sala privativa, previamente higienizada, e no mesmo laboratório onde eram realizadas as análises.

Antes da coleta era entregue ao sujeito um frasco estéril, identificado com o código do paciente e a amostra seminal era obtida através de masturbação. Ao término da coleta, o frasco era entregue pelo próprio paciente para um profissional do laboratório onde o acondicionava na incubadora a 37°C por cerca de 1 hora para aguardar a liquefação da amostra e iniciar a realização do exame.

Ao término da liquefação, a amostra era transferida para um tubo cônico graduado com uma pipeta *Pasteur* estéril para verificação do seu volume. Durante todo o período analisado, as amostras eram realizadas no mesmo laboratório e pela mesma equipe de biólogos com experiência em análises seminais.

Avaliação da concentração espermática

A diluição da amostra seminal era realizada em formalina (50g NaHCO_3 , 10mL de formalina a 35% e água destilada até completar 1 litro), seguindo a proporção determinada pelo biólogo responsável pela realização do exame. Uma alíquota após diluição era colocada em cada lado da câmara de Neubauer. Após um período para sedimentação das células a câmara era analisada em microscópio óptico com aumento

de 10X a 40X, sendo contado a quantidade de espermatozoides presentes nos 4 quadrados que correspondem as bordas bem como no quadrado central. A leitura foi realizada em duplicata, e a confiabilidade era avaliada a partir dos padrões da OMS (21-24) Os resultados das leituras das análises passavam por um fórmula matemática com padrão de correção de cada diluição para se obter a concentração final de milhões/mL.

Avaliação da motilidade espermática

Uma alíquota de 10µL da amostra de sêmen era colocada em duas lâminas sob lamínulas para dupla avaliação em microscópio óptico, seguindo os critérios recomendados pelos manuais da OMS (21-24). Eram contados pelo menos um total de 100 espermatozoides em cada lâmina, classificando-os em: grau A (motilidade progressiva rápida ou velocidade $\geq 25\mu\text{m}$ por segundo); grau B (motilidade progressiva lenta ou velocidade $< 25\mu\text{m}$ por segundo); grau C (motilidade não progressiva ou velocidade $< 5\mu\text{m}$ por segundo); ou D (espermatozoides imóveis), demonstrando resultados percentuais em cada categoria. A motilidade também foi classificada em progressiva (soma da porcentagem de espermatozoides classificados como grau A e B) e motilidade progressiva total (soma da porcentagem de espermatozoides classificados como grau A, B e C) (24).

Avaliação da morfologia espermática

De forma simultânea, duas lâminas de esfregaço eram preparadas, cada uma contendo 10µl de sêmen, que após a secagem eram submetidas a coloração clássica de Papanicolau (23). Após este processo as lâminas eram deixadas secando para posterior contagem dos espermatozoides. Para a contagem as lâminas eram colocadas em

microscópio óptico em aumento de 100X com contraste de fase. Cerca de 100 espermatozoides eram analisados em duplicata, sendo classificados como normais ou anormais segundo características da cabeça, acrossoma, peça intermediária e cauda, além do tamanho e área do espermatozoide (21-24). As avaliações eram realizadas de acordo com os manuais da OMS disponíveis à época dos exames.

Processamento seminal

Para se avaliar a possibilidade da realização de inseminação intrauterina, que corresponde a uma técnica de reprodução assistida de baixa complexidade, constantemente os clínicos que realizavam os atendimentos dos casais solicitavam a realização do processamento seminal com a mesma amostra usada para o espermograma diagnóstico. Este processamento era feito através de duas lavagens da amostra em tubo cônico estéril, adicionando quantidades iguais do esperma e PBS comercial (Dulbecco's phosphate buffered saline; GIBCO). Eram realizadas duas centrifugações no material por 10 minutos/cada a 300xg, sendo que o sobrenadante era descartado e o *pellet* guardado para a técnica de *swim-up*. Ao *pellet* restante era adicionado 1mL de meio HTF modificado (com HEPES) suplementado à 10% com Serum Substitute Supplement (SSS_Irvine Scientific, Santa Ana, CA, USA), homogeneizando suavemente até o *pellet* se dissolver no meio. Este tubo contendo o material era então inclinado há um ângulo de 45° e incubado a 37°C durante o período de 1 hora. Após este período o primeiro mililitro superior do tubo era retirado suavemente, sendo este transferido para um novo tubo cônico estéril; adicionava-se 1,5mL de meio de cultura no volume retirado e era reservado para análise (23,24).

Avaliação da concentração espermática após processamento seminal

Uma alíquota da amostra diluída do pellet era colocada em uma câmara de Makler e analisada em microscópio óptico de 10X a 40X, sendo contados os espermatozoides presentes em uma fileira. A leitura era realizada em duplicada, e avaliada segundo padrões da OMS (23,24).

Análise estatística

A contagem total de espermatozoides móveis progressivos (TMSC), correspondente ao volume do ejaculado em mililitros multiplicado pela concentração de espermatozoides e pela proporção de espermatozoides tipo “A” e “B” divididos por 100 (56); a porcentagem de espermatozoides com morfologia normal; e a concentração espermática no sêmen após o processamento seminal foram consideradas como variáveis dependentes. A variável independente foi o ano da coleta do material para o espermograma. A idade do homem na data da coleta do exame foi considerada como variável de controle. Inicialmente, foi realizado uma análise descritiva de cada variável dependente, onde foi calculado a média, desvio-padrão, mediana, 5º, 25º, 75º e 95º percentis.

Para avaliar a variação dos parâmetros numéricos ao longo dos anos de coleta foi utilizada a análise de regressão linear para os valores de mediana, devido à ausência de distribuição normal, na população total e categorizada por faixa etária (<30, 30-39 e > 40 anos). As duas primeiras edições do manual da OMS para o exame e processamento seminal recomendavam o uso de critérios liberais para a classificação da morfologia (20,21). A terceira edição publicada em 1992 (22), passou a recomendar uma aplicação de critérios mais rigorosos para classificar a morfologia espermática. Devido a esse fato,

optamos por desconsiderar os anos anteriores a 1993 na análise da morfologia dos espermatozoides. O nível de significância foi estabelecido em 5% e o programa utilizado para a análise foi o SPSS versão 20 (IBM Corp., Armonk, NY, USA).

4. RESULTADOS

manuscripttrackingsystem


SCIENTIFIC REPORTS | nature research

[tracking system home](#) | [author instructions](#) | [reviewer instructions](#) | [? help](#) | [tips](#) | [X logout](#) | [journal home](#)

Your manuscript has been successfully submitted to *Scientific Reports*. Your manuscript tracking number is: SREP-19-39082

All submissions are subject to a quality check after which you will receive either a confirmation that the manuscript has passed the quality check or an email detailing quality check feedback.

[Return Home](#) [Go to Manuscript](#)

 **eJournalPress**

[tracking system home](#) | [author instructions](#) | [reviewer instructions](#) | [help](#) | [tips](#) | [logout](#) | [journal home](#) | [terms of use](#)
[privacy policy](#) | [cookie policy](#) | [manage cookies](#)

Changes in seminal parameters among Brazilian men between 1989 and 2018

Samyra Siqueira

Department of Obstetrics and Gynecology, University of Campinas (UNICAMP)
Campinas-SP, Brazil

Anne Caroline Ropelle

Department of Obstetrics and Gynecology, University of Campinas (UNICAMP)
Campinas-SP, Brazil

Josiane Nascimento

Department of Obstetrics and Gynecology, University of Campinas (UNICAMP)
Campinas-SP, Brazil

Francisco Fazano

Department of Obstetrics and Gynecology, University of Campinas (UNICAMP)
Campinas-SP, Brazil

Luis Guillermo Bahamondes

Department of Obstetrics and Gynecology, University of Campinas (UNICAMP)
Campinas-SP, Brazil

José Roberto Erbolato Gabiatti, MD, PhD

Department of Obstetrics and Gynecology, University of Campinas (UNICAMP)
Campinas-SP, Brazil

Lúcia Costa-Paiva, MD, PhD

Department of Obstetrics and Gynecology, University of Campinas (UNICAMP)
Campinas-SP, Brazil

Luiz Francisco Baccaro, MD, PhD (corresponding author)*

Department of Obstetrics and Gynecology, University of Campinas (UNICAMP)
Rua Alexander Fleming, 101, Cidade Universitária Zeferino Vaz
Postal Code: 13083-881
Campinas-SP, Brazil
Phone/fax: +55 19 3521 9306
E-mail: baccaro@unicamp.br

Funding Organization: None.

Conflict of interest

The authors declare no conflicts of interest.

Abstract

Aiming to investigate trends in seminal parameter values among Brazilian men between 1989 and 2018, we performed a retrospective analysis of spermograms of couples admitted for infertility testing at UNICAMP/Brazil. For the present study, only the first sample produced by each man was analyzed (11,472 samples). Totile motile sperm count (TMSC), percentage of spermatozoa with normal morphology (NM), and sperm concentration after seminal processing (SCA) were considered dependent variables. Statistical analysis was carried out through linear regression for the median values both in the general population and in the population categorized by age group (<30, 30–39, and ≥40 years). During the study period, the mean age of men was 32.36 (\pm 6.49) years, with a median of 32 (18-67) years. We found a significant decrease in the median values of TMSC (reduction of 1.93 million/year), NM (reduction of 0.84% each year) and SCA (reduction of 0.14 million/mL each year). In conclusion, we observed that Brazilian men undergoing infertility investigation had a decline in seminal parameters in the past 29 years. Surveillance should be maintained in the coming years, and further studies are needed to elucidate possible causes for seminal deterioration and to devise strategies to reverse this trend.

Introduction

Infertility affects over 186 million people worldwide, predominately from developing countries [1]. It is recognized by the World Health Organization (WHO) as a disease and a public health problem that can cause harmful physical and psychological consequences for both women and men, as well as psychological distress and social stigmatization [2]. The male factor accounts for 20% of infertility cases and contributes to about 30–40% of cases. Seminal analysis is a necessary step to assess possible infertility [3].

A possible decline in world seminal parameters has been suggested by several researchers. A study published in 2017 noted a decline in seminal quality in young Chinese men over a 15-year period [4]. Over the past 35 years, an average 57% decline in sperm concentration has been reported worldwide [5]. From 1973 to 2011, authors reported a 50–60% decline in male sperm concentration in North America, Europe, Australia, and New Zealand [6]. In Brazil, some authors have also published data on declining concentrations and percentage of morphologically normal sperm [7-8]. Possible reasons for these changes in seminal parameters may be related to lifestyle, habits, age, alcohol or tobacco consumption, as well as endocrine factors, obesity, diet, and coffee consumption [9].

Although studies suggest a decline in seminal quality in men around the world, there is still some doubt as to whether this phenomenon has actually been occurring, or whether the observed decline could be due to changes in laboratory techniques and the different statistical approaches used to study the subject [10]. Thus, this study aimed to investigate the changes in seminal parameters over the past 29 years in Brazilian men who underwent marital infertility investigation in a hospital in southeastern Brazil.

Results

Subjects and samples

In total, we evaluated 11,472 samples produced by 11,472 men (1 sample per man) who underwent infertility testing between January 1989 and June 2018 (**Figure 1**). During the study period, the mean age of these men was 32.36 (± 6.49) years, with a median of 32.00 (range 18.00 to 67.00) years. By stratifying the men by age group, 3,999 (34.86%) men were under 30 years of age, 6,062 (52.84%) were between 30 and 39 years of age, and 1,411 (12.29%) were 40 years of age or older. The main characteristics of the samples collected throughout the study period are shown in **Table 1**.

Total motile sperm count

Regarding the total motile sperm count (TMSC) in the samples, we found a significant trend towards a decrease in median value over the years (reduction of 1.93 million progressive motile sperm each year) (**Figure 2a**). Controlling for age, we observed a similar downward trend in the median TMSC in the three age groups evaluated (a reduction of 1.79 million progressive motile sperm each year in the age group <30 years, a reduction of 2.13 million progressive motile sperm each year in the age group between 30 and 39 years, and a reduction of 1.65 million progressive motile sperm each year in the age group ≥ 40 years) (**Figure 2b**).

Sperm morphology

Regarding the percentage of sperm with normal morphology, we found a significant tendency towards a reduction in the median value over the years (reduction of 0.84% each year) (**Figure 3a**). Controlling for age, we observed a similar tendency towards a decrease

in the median percentage of sperm with normal morphology in the three evaluated age groups (reduction of 0.87% per year in the age group <30 years, reduction of 0.85% per year in the age group between 30 and 39 years, and reduction of 0.82% per year in the age group ≥ 40 years) (**Figure 3b**).

Sperm concentration after processing

Regarding sperm concentration after seminal processing, we found a significant tendency towards a decrease in the median value of post-processing concentration (reduction of 0.14 million/mL each year) (**Figure 4a**). Controlling for age, we did not find a downward trend in the median post-processing concentration in men under 30 years of age. In the age group between 30 and 39 years and in the age group ≥ 40 years, we observed a significant downward trend in sperm concentration after seminal processing (reduction of 0.17 million/mL each year and reduction of 0.29 million/mL each year, respectively) (**Figure 4b**).

Discussion

The theory of declining semen quality in men around the world is still a matter of debate. Our study aimed to investigate the influence of the exam collection year on the semen quality in 11,472 Brazilian men investigated for infertility by analyzing the first semen sample evaluated in our laboratory. The total number of progressive mobile sperm and the percentage of morphologically normal sperm were investigated. In addition, among these samples, 3,972 were also analyzed for sperm concentration after the seminal swim-up processing technique. We observed a reduction in the three parameters analyzed

during the period investigated and the results add elements to the discussion about semen quality trends.

According to the standards of the latest WHO manual, to be considered normal, a semen sample should have a sperm concentration ≥ 15 million/mL and $\geq 32\%$ of progressively motile sperm [11]. However, some authors suggest that these values have no prognostic relevance [12,13]. In the present study, we analyzed the TMSC, which has been shown to be the parameter with the best correlation with the occurrence of spontaneous pregnancy. According to Hamilton and colleagues, TMSC values greater than 20×10^6 are considered normal [13].

Between 1989 and 2018, we observed a significant decline in the median TMSC in the three age groups analyzed. Among men aged under 30 years, there was a reduction of 1.79 million/year; among men aged 30–40 years, the reduction was 2.13 million/year; and among men aged over 40 years, we observed a reduction of 1.65 million/year. These results are in line with those recently reported by Tiegs and colleagues. Analyzing the first semen sample of 119,972 men undergoing infertility investigation at two centers, one in Spain and one in the United States, the authors observed that the proportion of men with normal TMSC had dropped by approximately 10% over the past 16 years [14]. Recently, Huang et al. [4] analyzed samples produced by a total of 30,636 young Chinese men who had applied to be sperm donors between 2001 and 2015. Among these, the mean sperm concentration dropped significantly from 68 million/mL between 2001 and 2005 to 47 million/mL between 2011 and 2015. Specifically considering spermatozoa with progressive motility, Huang et al. did not find a decreasing trend in relative frequency; however, they observed a significant decrease in the absolute number of spermatozoa,

with averages falling from 34 million between 2001 and 2005 to 21 million between 2011 and 2015 [4].

Sperm morphology may influence the chance of spontaneous pregnancy [15]. Authors suggest that the temporal trend of decreasing percentage of sperm with normal morphology can be explained by the different classification criteria used by WHO over the years. The first two editions of the WHO Manual on Human Semen Analysis [16,17] recommended the use of liberal criteria for morphology classification [18]. The third edition of the manual [19] recommended that strict criteria should be applied to consider a sperm as morphologically normal. This made cells previously classified as normal to be considered morphologically altered. To avoid the influence of this difference in classification, we chose to exclude from the analysis the period from 1989 to 1992, i.e. prior to the publication of the third edition of the WHO manual. Adopting this strategy, we observed a decrease in the median percentage of normal sperm, which went from 42% in 1993 to 4% in 2018. This reduction was significant in the three age groups evaluated. It is noteworthy that the median of morphologically normal sperm observed in 2018 is equal to the lower limit of normality according to the latest WHO manual [11], that is, 50% of men evaluated in 2018 were classified as having teratozoospermia. Similar results were obtained by other authors. In 2017, Huang et al. observed a significant reduction in the average number of morphologically normal sperm, which went from 31.8% between 2001 and 2005 to 10.8% between 2011 and 2015 [4]. Rolland and colleagues also noted a decrease in normal morphology values, which they believe were not just due to the change in cell classification [20]. Authors who published Brazilian data showed a decline from 4.6% between 2000 and 2002 to 2.7% between 2010 and 2012 [8].

With the advancement of assisted reproduction techniques, there was a need for selection of morphologically normal and non-germ cell-free sperm [11]. The swim-up technique consists of the selection of sperm with greater mobility, ability to swim in the culture medium and theoretically, with greater potential to fertilize the egg [21]. To analyze sperm concentration in the semen after the swim-up technique in 3,972 available samples, we also built different statistical models by age group. Thus, we observed a decrease in median post-processing concentration values in the general group, and more specifically in men over 30 years of age. The median in the overall group which was 8.0 million/mL in 2005 fell to 2.75 million/mL in 2018. This deserves special attention, as some authors consider 5.0 million/mL to be the lowest acceptable value for intrauterine insemination [22]. It is not known to us that other publications have evaluated the temporal tendency of sperm concentration after seminal processing in other populations. We believe this is also a variable that may indicate a decrease in semen quality. This finding is consistent with our finding regarding morphology, as, in theory, the swim-up technique selects morphologically normal sperm [11].

The possible causes for the fall in some seminal quality parameters are a matter of debate. Smoking [23], alcohol abuse [24], lifestyle, excessive coffee consumption [9], and even the use of mobile phones with radiofrequency electromagnetic radiation emission [25] are cited as possible culprits of the deterioration of semen quality in recent years. Environmental agents such as air and water pollutants could also act as “endocrine disruptors”. These substances would have estrogen-like effects and could act on the male fetus even during pregnancy, leading to testicular changes known as “testicular dysgenetic syndrome”. This syndrome, in addition to having poor seminal quality, could also increase the frequency of hypospadias, cryptorchidism, and testicular cancer [26]. Among the

possible causes for the decrease observed in the seminal quality parameters, one that seems most plausible to us is obesity. In recent years, Brazil has experienced an increase in the prevalence of this disease [27]. Hypoandrogenism due to accumulation of adipose tissue [28] may impair spermatogenesis, leading to worsening of seminal parameters [28]. Due to the retrospective character of the study, we did not have access to clinical and sociodemographic data of the men who produced the samples, which made it impossible to investigate possible causes for the observed decline in seminal quality.

This study had limitations that should be mentioned. The men evaluated were more likely to be subfertile due to the fact that they were objectively being investigated for marital infertility. However, the difficulty in obtaining seminal samples is well known [10], and the population of subfertile men is the one that most needs seminal evaluation. Studies with sperm donors may also show the selection bias of men with above average fertility capacity [10]. Although all men received counselling to abstain from sexual activity for 3 to 5 days, we were not able to objectively control this variable. As reported in previous studies, one study period probably should not have been more influenced than the other by this possible confounding factor [30]. We could not establish a hypothesis for the possible decline in seminal quality because we did not have the clinical and sociodemographic data of men. Since semen samples were produced by men residing in a specific region of the country, the conclusions cannot be generalized to other regions of the country and the world. We believe that since we analyzed a considerable number of samples produced over a long period, the results obtained are valid. The fact that the analyzes were always performed in the same laboratory by the same team of professionals reduces the possible interobserver variation.

In conclusion, a possible drop in semen quality could have serious consequences for future generations. From 1989 to 2018, we observed that Brazilian men undergoing marital infertility investigation had a decline in the total number of progressive mobile sperm, a decreased percentage of sperm with normal morphology, and a reduction in sperm concentration after seminal processing. Surveillance of seminal parameters should be maintained in the coming years, and further studies are needed to elucidate possible causes for seminal deterioration and to devise strategies to reverse this trend.

Methods

Study population

The Human Reproduction Laboratory (LRH) of University of Campinas (UNICAMP) Women's Hospital has been conducting sperm analysis since 1989, and all results are passed on in a computerized system currently in its latest version. 6.16 of 11/13/2013. This is a system that allows the export of all archived data to Microsoft Excel spreadsheets. This study consists of a retrospective analysis of sperm counts performed between the period 01/03/1989 and 06/29/2018.

For this study, the analyzed population consisted of all male partners of couples admitted to the UNICAMP outpatient clinic for marital infertility investigation. Couples had failed to achieve pregnancy after a period of 12 months or more with regular sex and without any contraceptive method. After exporting all sperm data during this period, a database of 29,487 semen samples produced by 11,472 men was produced. For the present study, only the first sample produced by each man was analyzed (11,472). This database consisted of different sperm parameters besides the date of the exam and the age of the man at the date of the sample collection. There were also data from 3,972

samples of seminal processing performed by the swim-up technique to assess the possibility of future intrauterine insemination. As this was a retrospective analysis, no clinical and sociodemographic data such as race, education, and personal habits were available. All methods were carried out in accordance with relevant guidelines and national regulations. The experimental protocol was approved by the University of Campinas Research Ethics Committee under number 59911516.5.0000.5404. As this was a retrospective study based on database review, not compromising the privacy of subjects, the University of Campinas Research Ethics Committee waived the signing of informed consent.

Seminal analysis

The men who were going to have the sperm exam were instructed at the time of appointment to maintain sexual abstinence for a period of 3 to 5 days before the date of collection [11]. The collections were performed in a private room, previously sanitized, and in the same laboratory where the analyzes were performed. The seminal sample was obtained by masturbation in a sterile vial previously identified with the patient code. At the end of collection, the vial was delivered by the patient himself to a laboratory professional where he placed it in the incubator at 37°C for about 1 hour for sample liquefaction. At the end of liquefaction, the sample was transferred to a graduated conical tube with a sterile Pasteur pipette for volume verification. During the whole period of analysis, the samples were taken in the same laboratory and by the same team of biologists with experience in seminal analyzes.

Evaluation of sperm concentration

Seminal sample dilution was performed in formalin (50 g NaHCO_3 , 10 mL 35% formalin, and distilled water to 1 liter), following the ratio determined by the biologist responsible for the examination. After dilution, an aliquot was placed on either side of the Neubauer chamber. After a period for cell sedimentation, the chamber was analyzed by optical microscope with 10X to 40X magnification, counting the amount of sperm present in the four squares corresponding to the edges, as well as in the central square. Reading was performed in duplicate, and reliability was assessed from WHO standards [11,16,17,31]. The results of the analysis readings were submitted to a mathematical formula with a correction standard of each dilution to obtain the final concentration of millions/mL.

Evaluation of sperm motility

A 10 μL aliquot of the semen sample was placed on two coverslips for double evaluation under an optical microscope, following the criteria recommended by WHO manuals [11,16,17,31]. At least 100 sperm were counted in each slide, classifying them as: grade A (rapid progressive motility or velocity $\geq 25 \mu\text{m}$ per second); grade B (slow progressive motility or speed $< 25 \mu\text{m}$ per second); grade C (non-progressive motility or speed $< 5 \mu\text{m}$ per second); or D (immobile sperm), showing percentage results in each category. Motility was also classified as progressive (sum of percentage of sperm classified as grade A and B) and total motility (sum of percentage of sperm classified as grade A, B, and C) [11].

Evaluation of sperm morphology

Simultaneously, two smear slides were prepared, each containing 10 µl of semen, which after drying were subjected to fixation according to the WHO manual [31], and after drying, the sperm count was performed. For counting, the slides were placed under 100X magnification with phase contrast. About 100 sperm were analyzed in duplicate and classified as normal or abnormal according to the characteristics of the head, acrosome, intermediate part and tail, plus the size of the sperm and their areas [11,16,17,31]. Evaluations were performed according to WHO manuals available at the time of the exams.

Seminal processing

In order to evaluate the possibility of intrauterine insemination, which corresponds to a low complexity assisted reproduction technique, clinicians who performed the couples' care constantly requested seminal processing with the same sample used for the diagnostic analysis. This was done by two sample washes in a sterile conical tube, adding equal amounts of sperm and commercial PBS (Dulbecco's phosphate buffered saline; GIBCO Laboratories, Grand Island Biological Co., Grand Island, NY, USA). Two centrifugations were performed in the material for 10 minutes/300 xg each; the supernatant was discarded, and the pellet was stored for the swim-up technique. Next, 1 mL of modified (with HEPES) HTF medium supplemented with 10% Serum Substitute Supplement (SSS_Irvine Scientific, Santa Ana, CA, USA) was added to the remaining pellet and gently homogenized until the pellet dissolved in the medium. This tube containing the material was then tilted at an angle of 45° and incubated at 37°C for 1 hour. After this period, the first upper mL of the tube was gently removed and transferred to a

new sterile conical tube, and 1.5 mL of culture medium was added and reserved for analysis [11,31].

Evaluation of sperm concentration after seminal processing

An aliquot of the diluted pellet sample was placed in a Makler chamber and analyzed under a 10X to 40X light microscope, counting the sperm present in a row. Reading was performed in duplicate and assessed according to WHO standards [11,31].

Statistical analysis

The following were considered dependent variables: 1) the total TMSC, corresponding to the volume of ejaculate in mL multiplied by the sperm concentration and the proportion of sperm with motility grade “A” and “B” divided by 100, 2) the percentage of sperm with normal morphology, 3) the sperm concentration in semen after seminal processing. The independent variable was the year of semen collection. The age of the man at the time of collection was considered as a control variable. Initially, a descriptive analysis of each dependent variable was performed, with calculation of mean, standard deviation, median, and 5th, 25th, 75th, and 95th percentiles.

To evaluate the dependent variables over the years of collection, a linear regression analysis for the median values was used, due to the absence of normal distribution, both in the general population and in the population categorized by age group (<30, 30–39, and ≥40 years). The first two editions of the WHO Manual for Seminal Examination and Processing recommended the use of liberal criteria for the classification of morphology [16,17]. The following editions, published from 1992 [19], came to recommend the application of stricter criteria for classifying spermatoc morphology. Thus, we chose to

disregard the years prior to 1993 in the analysis of sperm morphology. The significance level was set at 5%, and the program used for the analysis was SPSS version 20 (IBM Corp., Armonk, NY, USA).

Author Contributions

SS and ACR contributed to study conception and wrote the manuscript. JN and FF contributed to project development and data collection. LGB, JREG and LCP contributed to study conception and design. LFB contributed to study conception, design, data analysis and wrote the manuscript. All authors reviewed and approved the final manuscript.

Competing Interests Statement

The authors declare no potential conflicts of interest.

Data Availability

The datasets generated during and/or analyzed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

References

1. Vander Borgh M, Wyns C . Fertility and infertility: definition and epidemiology. Clin Biochem. 62, 2-10 (2018).
2. Louis JF, et al. The prevalence of couple infertility in the United States from a male perspective: evidence from a nationally representative sample. Andrology.1(5):741-8 (2013).
3. Nallella KP, Sharma RK, Aziz N, Agarwal A. Significance of sperm characteristics in the evaluation of male infertility. Fertil Steril. 85(3), 629-34 (2006).
4. Huang C, et al. Decline in semen quality among 30,636 young Chinese men from 2001 to 2015. Fertil Steril.107(1), 83-8.e2 (2017).
5. Sengupta P, Nwagha U, Dutta S, Krajewska-Kulak E, Izuka E. Evidence for decreasing sperm count in African population from 1965 to 2015. Afr Health Sci. 17(2), 418-27 (2017).
6. Levine H, *et al.* Temporal trends in sperm count: A systematic review and meta-regression analysis. Hum Reprod Update. 23(6), 646-59 (2017).
7. Glina S, et al. Evaluation of semen parameters in semen donors in a ten-year period in the city of São Paulo. Einstein (Sao Paulo). 8(4), 423-9 (2010).
8. Borges E Jr, Setti AS, Braga DP, Figueira ReC, Iaconelli A. Decline in semen quality among infertile men in Brazil during the past 10 years. Int Braz J Urol. 41(4), 757-63 (2015).
9. Durairajanayagam D. Lifestyle causes of male infertility. Arab J Urol. 16(1), 10-20 (2018).
10. Fisch H. Declining worldwide sperm counts: disproving a myth. Urol Clin North Am. 35(2),137-46, vii (2008).
11. World Health Organization. WHO laboratory manual for the Examination and processing of human semen. 5th edition. Geneva, Switzerland. (2010).

12. Esteves SC, Zini A, Aziz N, Alvarez JG, Sabanegh ES Jr, Agarwal A. Critical appraisal of World Health Organization's new reference values for human semen characteristics and effect on diagnosis and treatment of subfertile men. *Urology*. 79(1),16-22 (2012).
13. Hamilton JA et al. Total motile sperm count: a better indicator for the severity of male factor infertility than the WHO sperm classification system. *Hum Reprod*. 30(5),1110-21 (2015).
14. Tiegs AW, Landis J, Garrido N, Scott RT Jr, Hotelling JM. Total Motile Sperm Count Trend Over Time: Evaluation of Semen Analyses From 119,972 Men From Subfertile Couples. *Urology*. 132, 109-116 (2019).
15. Menkveld R. Clinical significance of the low normal sperm morphology value as proposed in the fifth edition of the WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen. *Asian J Androl*. 12(1), 47-58 (2010).
16. World Health Organization. WHO laboratory manual for the examination of human semen and semen-cervical mucus interaction, 1st edn. Singapore: Press Concern (1980).
17. World Health Organization. WHO laboratory manual for the examination of human semen and semen-cervical mucus interaction, 2nd edn. Cambridge: Cambridge University Press (1987).
18. Comhaire F, Schoonjans F, Vermeulen L, De Clercq N. Methodological aspects of sperm morphology evaluation: comparison between strict and liberal criteria. *Fertil Steril*. 62, 857–61 (1994).
19. World Health Organization. WHO laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction, 3rd edn. Cambridge: Cambridge University Press (1992).

20. Rolland M, Le Moal J, Wagner V, Royère D, De Mouzon J. Decline in semen concentration and morphology in a sample of 26,609 men close to general population between 1989 and 2005 in France. *Hum Reprod.* 28(2), 462-70 (2013).
21. Goldenberg M, Rabinovici J, Bider D, Lunenfeld B, Blankstein J, Weissenberg R. Intra-uterine insemination with prepared sperm vs. unprepared first split ejaculates. A randomized study. *Andrologia.* 24(3), 135-40 (1992).
22. Khalil MR, Rasmussen PE, Erb K, Laursen SB, Rex S, Westergaard LG. Homologous intrauterine insemination. An evaluation of prognostic factors based on a review of 2473 cycles. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 80, 74– 81 (2001).
23. Mostafa T. Cigarette smoking and male infertility. *J Adv Res.* 1(3), 179-86 (2010).
24. Ricci E et al. Semen quality and alcohol intake: a systematic review and meta-analysis. *Reprod Biomed Online.* 34(1), 38–47 (2017).
25. Adams JA, Galloway TS, Mondal D, Esteves SC, Mathews F. Effect of mobile telephones on sperm quality: a systematic review and meta-analysis. *Environ Int.* 70, 106-12 (2014).
26. Joffe M. What has happened to human fertility? *Hum Reprod.* 25(2), 295-307 (2010).
27. Ribeiro AL, Duncan BB, Brant LC, Lotufo PA, Mill JG, Barreto SM. Cardiovascular Health in Brazil: Trends and Perspectives. *Circulation.* 133(4), 422-33 (2016).
28. Mohr BA, Bhasin S, Link CL, O'Donnell AB, McKinlay JB. The effect of changes in adiposity on testosterone levels in older men: longitudinal results from the Massachusetts Male Aging Study. *Eur J Endocrinol.* 155(3), 443-52 (2006)
29. Sermondade N *et al.* BMI in relation to sperm count: an updated systematic review and collaborative meta-analysis. *Hum Reprod Update.* 19(3), 221–31 (2013).

30. Baker K, Li J, Sabanegh E Jr. Analysis of semen parameters in male referrals: impact of reference limits, stratification by fertility categories, predictors of change, and comparison of normal semen parameters in subfertile couples. *Fertil Steril*. 103(1), 59-65 (2015).
31. World Health Organization. WHO laboratory manual for the examination of human semen and semen-cervical mucus interaction. 4th ed. Cambridge, UK: Cambridge University Press (1999).

Figure Legends

Figure 1. Study population between 1989 and 2018

Figure 2. Total motile sperm counts (median) between 1989 and 2018 - linear regression (n= 11,472)

A – Total group

B – Population categorized by age group

TMSC – Total motile sperm count (millions)

Figure 3. Sperm with normal morphology (median) between 1989 and 2018 - linear regression (n=11,472)

A – Total group

B – Population categorized by age group

Figure 4. Sperm concentration after seminal processing (millions/ml, median) between 1989 and 2018 - linear regression (n=3,972)

A – Total group

B – Population categorized by age group

Tables

Table 1. Men's age at sample collection and main characteristics of the samples collected throughout the study period (11472)

Parameter	Mean (SD)	Minimum	25%	Median	75%	Maximum
Age (years)	32.36 (6.49)	18.00	28.00	32.00	36.00	67.00
Volume (ml)	2.99 (1.55)	0.10	2.00	2.80	4.00	20.00
Sperm concentration (millions/ml)	74.01 (84.94)	0.00	15.00	49.00	105.00	1072.00
Total sperm number	210.24 (257.33)	0.00	36.00	129.00	295.00	3400.00
TMSC	98.22 (133.08)	0.00	10.92	50.75	135.71	1896.0
Vitality (live spermatozoa, %)	64.03 (25.77)	0.00	61.00	72.00	80.00	100.00
Sperm morphology (normal forms, %)	14.48 (17.47)	0.00	4.00	10.00	16.00	99.00
Sperm concentration after seminal processing*	10.51 (17.07)	0.00	0.70	5.00	12.00	220.00

TMSC: total motile sperm count

*3,972 samples

Figure 1. Study population between 1989 and 2018

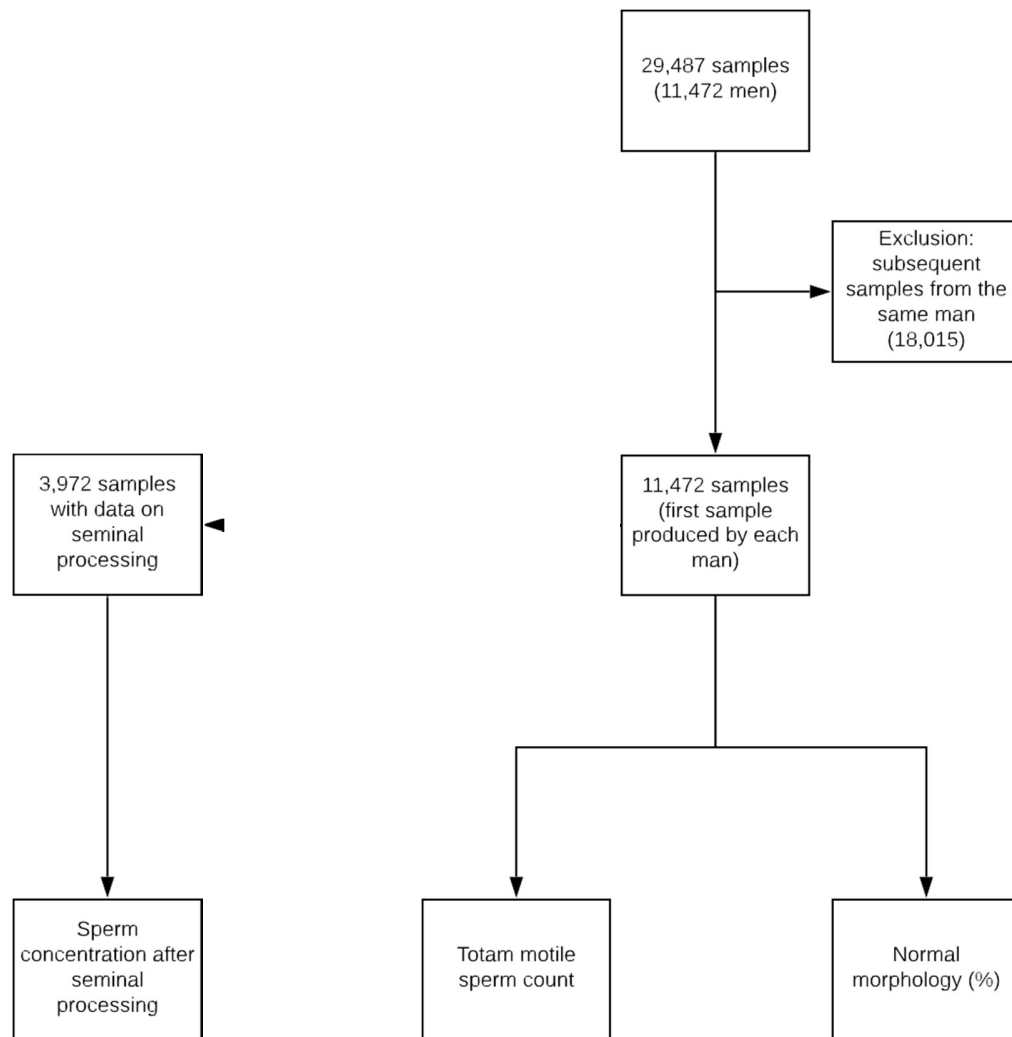
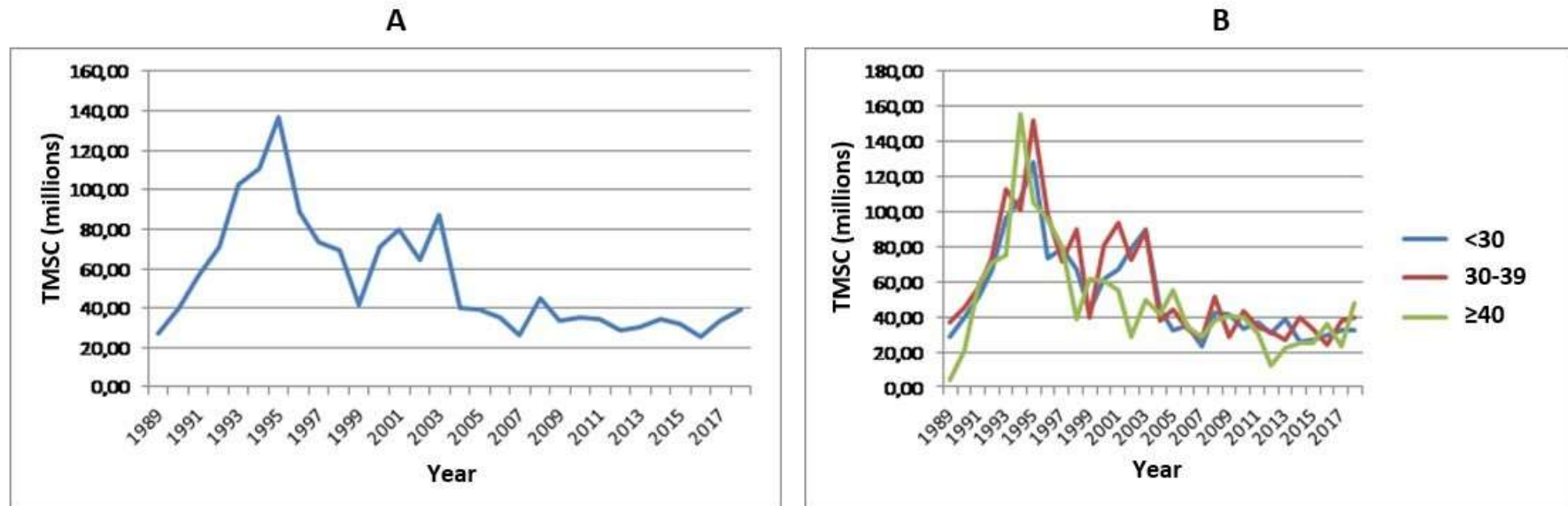


Figure 2 - Total motile sperm counts (median) between 1989 and 2018 - linear regression (n= 11,472)



Total (n=11,472)

Intercept or linear coefficient: $A=82.4$; $SE(A)=8.44$; $t=9.76$; $P<0.001$

Inclination or angular coefficient: $B=-1.925$; $SE(B)=0.5$; $t=-3.85$; $P<0.001$

Age < 30 years-old

Intercept or linear coefficient: $A=78.71$; $SE(A)=7.97$; $t=9.87$; $p<0.001$

Inclination or angular coefficient: $B=-1.792$; $SE(B)=0.472$; $t=-3.80$; $p<0.001$

Age 30 - 39 years-old

Intercept or linear coefficient: $A=89.11$; $SE(A)=9.22$; $t=9.67$; $p<0.001$

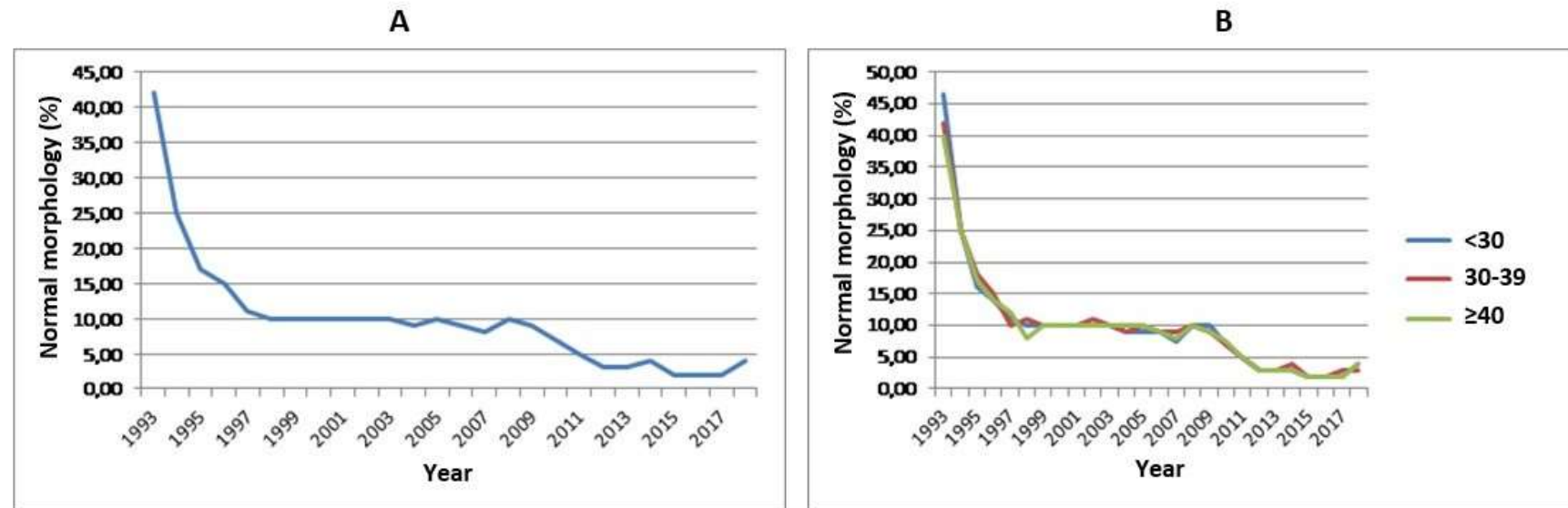
Inclination or angular coefficient: $B=-2.127$; $SE(B)=0.546$; $t=-3.90$; $p<0.001$

Age ≥ 40 years-old

Intercept or linear coefficient: $A=72.57$; $SE(A)=9.98$; $t=7.27$; $p<0.001$

Inclination or angular coefficient: $B=-1.650$; $SE(B)=0.591$; $t=-2.79$; $p=0.009$

Figure 3. Sperm with normal morphology (median) between 1989 and 2018 - linear regression (n= 11,472)



Total (n=11,472)

Intercept or linear coefficient: $A=20.35$; $SE(A)=2.06$; $t=9.88$; $p<0.001$

Inclination or angular coefficient: $B=-0.837$; $SE(B)=0.141$; $t=-5.92$; $p<0.001$

Age < 30 years-old

Intercept or linear coefficient: $A=20.74$; $SE(A)=2.38$; $t=8.73$; $p<0.001$

Inclination or angular coefficient: $B=-0.866$; $SE(B)=0.163$; $t=-5.31$; $p<0.001$

Age 30 - 39 years-old

Intercept or linear coefficient: $A=20.57$; $SE(A)=2.05$; $t=10.05$; $p<0.001$

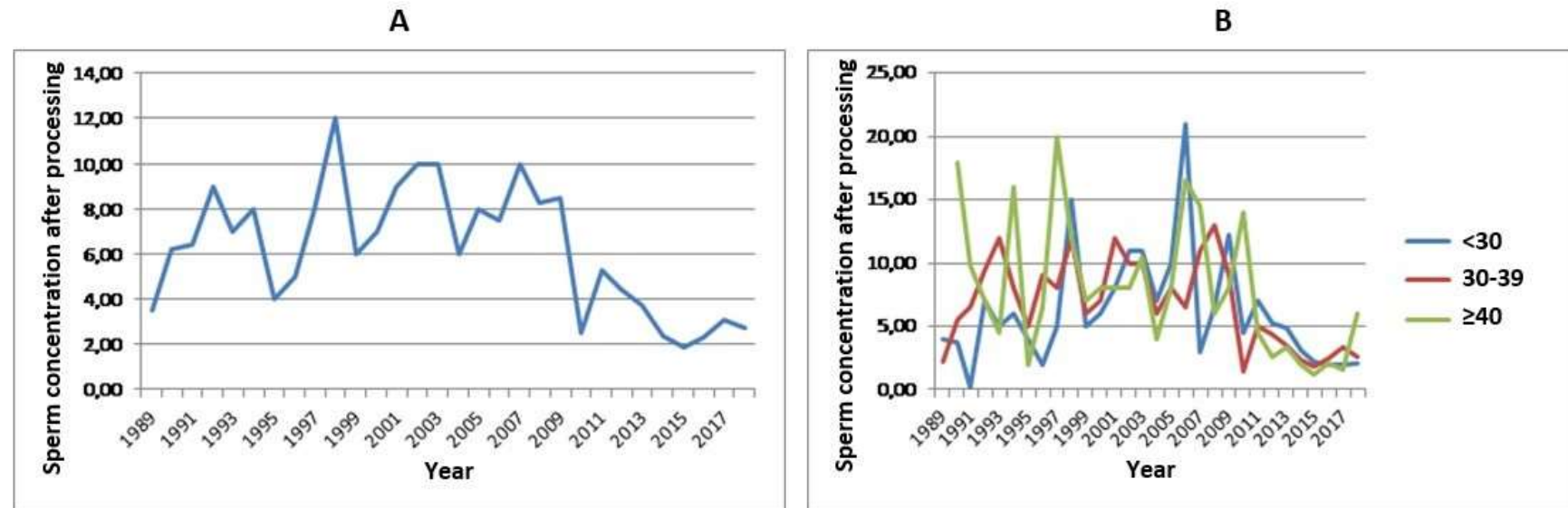
Inclination or angular coefficient: $B=-0.846$; $SE(B)=0.140$; $t=-6.03$; $p<0.001$

Age ≥ 40 years-old

Intercept or linear coefficient: $A=19.93$; $SE(A)=1.97$; $t=10.14$; $p<0.001$

Inclination or angular coefficient: $B=-0.815$; $SE(B)=0.135$; $t=-6.04$; $p<0.001$

Figure 4. Sperm concentration after seminal processing (millions/ml, median) between 1989 and 2018 - linear regression (n=3,972)



Total (n=3,972)

Intercept or linear coefficient: $A=8.27$; $SE(A)=0.90$; $t=9.19$; $p<0.001$

Inclination or angular coefficient: $B=-0.139$; $SE(B)=0.053$; $t=-2.60$; $p=0.01$

Age < 30 years-old

Intercept or linear coefficient: $A=6.58$; $SE(A)=1.60$; $t=4.12$; $p<0.001$

Inclination or angular coefficient: $B=-0.026$; $SE(B)=0.095$; $t=-0.28$; $p=0.78$

Age 30 - 39 years-old

Intercept or linear coefficient: $A=9.18$; $SE(A)=1.14$; $t=8.07$; $p<0.001$

Inclination or angular coefficient: $B=-0.167$; $SE(B)=0.067$; $t=-2.47$; $p=0.02$

Age ≥ 40 years-old

Intercept or linear coefficient: $A=12.38$; $SE(A)=1.81$; $t=6.85$; $p<0.001$

Inclination or angular coefficient: $B=-0.293$; $SE(B)=0.105$; $t=-2.78$; $p=0.01$

5. DISCUSSÃO GERAL

A teoria sobre o declínio da qualidade do sêmen mundial ainda permanece incerta, embora muitos pesquisadores tenham publicado trabalhos que reforçam esta hipótese. No presente estudo entre o período de 1989 até 2018 foi observado um declínio na concentração total de espermatozoides móveis progressivos (TMSC), uma diminuição na porcentagem de espermatozoides com morfologia normal e uma redução na concentração espermática após o processamento seminal.

Foram analisadas a concentração total de espermatozoides móveis progressivos e a porcentagem de espermatozoides morfolologicamente normais em 11.472 amostras colhidas entre os anos de 1989 e 2018 (primeira amostra colhida por cada homem no laboratório). Um total de 3.972 amostras também foi analisada em relação à concentração de espermatozoides após a técnica de processamento seminal pela técnica de *swim-up*.

O espermatozoide é um dos tipos celulares mais diferenciados, e o único que sai do corpo onde é produzido para alcançar seu objetivo no sistema reprodutor feminino, a fertilização do ovócito, e adquirir motilidade é essencial para esta função (57). Segundo o último manual da OMS, uma amostra de sêmen dentro dos padrões de normalidade deve apresentar uma concentração de espermatozoides ≥ 15 milhões por mL e $\geq 32\%$ de espermatozoides com motilidade progressiva (24). Para autores como Weert e colaboradores, não é recomendável realizar uma inseminação intrauterina (IIU) com valores abaixo de 20 milhões de espermatozoides com motilidade progressiva (58). No presente estudo analisamos a TMSC, que tem se mostrado um parâmetro com melhor correlação com a ocorrência de gestação espontânea (56).

Observamos uma tendência de redução significativa no valor mediano da TMSC entre 1989 e 2018, redução de 1,93 milhão/ano, além de ter sido observado redução nas três faixas etárias analisadas. Foi encontrado uma redução de 1,79 milhão/ano nos homens com <30 anos de idade, uma redução um pouco maior nos homens entre 30-39 anos, 2,13 milhões/ano, e redução de 1,65 milhão/ano no grupo de homens com >40 anos. Em 2019, Tiegs e colaboradores analisaram a primeira amostra de sêmen de 119.972 homens submetidos a investigação por infertilidade em dois centros, um na Espanha e outro nos Estados Unidos. Os autores relataram que a proporção de homens com TMSC normal caiu aproximadamente 10% nos últimos 16 anos (59). Outro estudo realizado nos EUA, de 2003 a 2013 em um banco de espermatozoides, observou uma queda na motilidade de 1,23% ao ano (60). Em 2012, Splingart e colaboradores observaram um declínio significativo na contagem total de espermatozoides de 1114 candidatos a doação de espermatozoides na França entre os anos de 1976 a 2009, encontrando uma diminuição de 443,2 milhões de espermatozoides em 1976 para 300,2 milhões de espermatozoides em 2009 (61).

A morfologia espermática vem sendo associada com subfertilidade e esterilidade há muitos anos e alguns autores já identificaram que espermatozoides com defeitos na cabeça têm dificuldade em atravessar o trato reprodutor feminino e/ou participar na fertilização dos ovócitos (62). Muitos são os artigos publicados com teorias sobre o declínio da morfologia normal dos espermatozoides e um consenso entre alguns deles é o da influência dos novos critérios da OMS. O interesse pela morfologia no espermatozoide começou em 1900, quando se observou que em uma mesma amostra seminal poderiam coexistir espermatozoides de forma normal e anormal e sua história é descrita em duas fases, que representam a evolução descrita pelos manuais da OMS, desde 1980 até a sua última edição em 2010 (63).

O primeiro manual publicado em 1980 (20) baseou-se na experiência clínica dos oitenta anos anteriores. A terceira edição do manual (22) recomendou que critérios estritos deveriam ser aplicados para se considerar um espermatozoide como morfolologicamente normal. Para evitar a influência dessa diferença de classificação, optamos por excluir da análise o período entre 1989 e 1992, apresentando os resultados a partir de 1993. Contudo, verificou-se tendência significativa de redução do valor mediano ao longo dos anos no período total, passando de uma média 42% em 1993 para 4% em 2018, bem como nas três faixas etárias estudadas. Também observamos que a mediana dos espermatozoides morfolologicamente normais em 2018 foi igual ao limite inferior de normalidade segundo o último manual da OMS (24), o que significa que 50% dos homens avaliados no período de 2018 foram classificados como portadores de teratozoospermia. Outros autores que publicaram dados do Brasil também encontraram um declínio da porcentagem de espermatozoides com morfologia normal. Borges e colaboradores demonstraram um declínio de 4,6% para 2,7% entre os períodos de 2000 a 2002 e 2010 a 2012 (47). Na China, Huang e colaboradores observaram redução significativa na média de espermatozoides morfolologicamente normais, que passou de 31,8% entre 2001 e 2005 para 10,8% entre 2011 e 2015, em seu estudo publicado em 2017 (39). Muitos autores avaliam que as variações nos padrões dos manuais da OMS influenciaram o declínio da morfologia no sêmen, mas que possivelmente essa não é a única causa.

Com o avanço das técnicas de reprodução assistida houve a necessidade de melhorar o processamento do esperma e a quantidade de espermatozoides móveis. A técnica de *swim-up* que foi originalmente descrita por Mahadevan e Baker é o método de lavagem mais antigo e comum usado na separação dos espermatozoides (36). A técnica consiste na seleção de espermatozoides com maior mobilidade e

habilidade de se movimentar no meio de cultura, por isso, espera-se que os espermatozoides recuperados após o *swim-up* tenham melhor qualidade e capacidade de fertilização (64). No presente estudo, analisamos a concentração de espermatozoides no sêmen após a realização da técnica de swim-up em 3972 amostras disponíveis. Com isso, observamos queda dos valores medianos de concentração pós processamento tanto no grupo geral, quanto nos grupos categorizados por faixas etárias, exceto nos homens com menos de 30 anos. Este achado é condizente com nosso achado quanto à morfologia, já que, em teoria, a técnica de swim-up seleciona espermatozoides morfolologicamente normais (24). Não encontramos outras publicações que tenham avaliado a tendência da concentração espermática após o processamento seminal em outras populações.

O tabagismo (48,49), o consumo excessivo de café (50) e de álcool (51) são citados como possíveis responsáveis por afetar a qualidade seminal. Os efeitos do cigarro sobre a produção de espermatozoides são relatados em alguns estudos, possivelmente levando à redução na produção de espermatozoides, bem como na motilidade progressiva e na morfologia normal. Além disso, pode haver diminuição da capacidade de fertilização em decorrência do aumento do estresse oxidativo e danos ao DNA (65,66). Pesquisadores também apontam que o tabagismo influencia de forma negativa a taxa de fertilização e a formação de blastocistos (67). Uma revisão sistemática com metanálise foi realizada para investigar se há relação entre o consumo de bebidas alcóolicas e a qualidade seminal. Foram incluídos 15 estudos transversais com 16.395 homens e os resultados demonstraram que o consumo de álcool tem efeito prejudicial sobre o volume e a porcentagem de espermatozoides com morfologia normal. Homens que consumiram álcool de forma moderada não apresentaram um efeito negativo nos parâmetros seminais (68).

Outra teoria discutida é a dos “disruptores endócrinos” que seriam substâncias que predisporiam o indivíduo a um desequilíbrio dos processos metabólicos (53,54), além de poderem aumentar a ocorrência de doenças como o câncer de testículo, a hipospádia e a criptorquidia, com um consequente declínio na qualidade seminal (53,54). Outra hipótese é a ação da radiação eletromagnética de radiofrequência (RF-EMR) emitida por telefones celulares, que possivelmente afetaria o desenvolvimento e a função dos espermatozoides (69). Dentre as possíveis causas para a queda dos parâmetros da qualidade seminal, a que nos parece mais plausível é a obesidade. Nos últimos anos o Brasil tem experimentado um aumento na prevalência desta doença (70). O hipoandrogenismo decorrente do acúmulo de tecido adiposo pode prejudicar a espermatogênese, levando a piora dos parâmetros seminais (52,71,72).

Os resultados obtidos no presente estudo são importantes para acrescentar dados de homens brasileiros aos relatos de outras populações ao redor do mundo, entretanto, devem ser analisados com cautela. A população estudada foi composta por parceiros masculinos em um casal investigado por infertilidade residindo em uma região específica do país. Todos os homens receberam orientação de abstinência sexual de 3 a 5 dias, porém não fomos capazes de controlar objetivamente esta variável. Como relatado em estudos prévios, provavelmente, um período do estudo não deve ter sido mais influenciado que o outro por esse possível fator confundidor (73). Não foi possível o acesso às variáveis clínicas, ambientais e sociodemográficas dos indivíduos, impossibilitando a elaboração de hipóteses para explicar o declínio da qualidade seminal.

Estudos relatam que a idade pode influenciar negativamente a qualidade seminal com um possível aumento na taxa de abortos em embriões concebidos por pais mais velhos (74). Alterações endócrinas e funcionais no testículo envelhecido,

podem diminuir a produção de testosterona (75). Um estudo publicado em 2018 observou um aumento na fragmentação de DNA e nas taxas de aneuploidias espermáticas em homens acima de 40 anos, além de menores taxas de transferências embrionárias e de gravidez clínica (76). Acreditamos que um dos pontos fortes de nosso estudo foi o fato de termos demonstrado uma queda da qualidade seminal independentemente da faixa etária estudada. Por termos analisado muitas amostras em um mesmo laboratório com a mesma equipe de profissionais, possivelmente reduzindo a variação interobservador, acreditamos que os resultados obtidos são válidos.

Mesmo com a crescente evolução tecnológica na área da medicina reprodutiva, um possível declínio na qualidade seminal pode apresentar sérias consequências para as gerações futuras. Novos estudos são necessários para manter a vigilância sobre os parâmetros seminais, revelar possíveis fatores associados à sua deterioração e elaborar estratégias para combater esse problema.

6. CONCLUSÃO

- Houve tendência significativa de redução dos valores medianos do número total de espermatozoides móveis progressivos na amostra durante o período analisado, tanto no grupo geral (redução de 1,93 milhões de espermatozoides móveis progressivos a cada ano), quanto no grupo categorizado por faixas etárias (redução de 1,79 milhões de móveis progressivos a cada ano na faixa etária <30 anos; redução de 2,13 milhões de móveis progressivos a cada ano na faixa etária entre 30 e 39 anos; redução de 1,65 milhões de móveis progressivos a cada ano na faixa etária ≥40 anos).
- Houve tendência significativa de redução do valor mediano da porcentagem de espermatozoides com morfologia normal, tanto no grupo geral (redução de 0,84% a cada ano), quanto no grupo categorizado por faixas etárias (redução de 0,87% ao ano na faixa etária <30 anos; redução de 0,85% ao ano na faixa etária entre 30 e 39 anos; redução de 0,82% ao ano na faixa etária ≥40 anos).
- Houve tendência significativa de redução do valor mediano da concentração de espermatozoides após processamento por *swim-up* tanto no grupo geral (redução de 0,14 milhões/mL a cada ano), quanto nos grupos categorizados por faixas etárias, exceto nos homens com menos de 30 anos (redução de 0,17 milhões/mL a cada ano na faixa etária entre 30 e 39 anos; redução de 0,29 milhões/mL a cada ano na faixa etária ≥ 40 anos).

7. REFERÊNCIAS

1. Borghot M Vander, Wyns C. Fertility and infertility : Definition and epidemiology. Clin Biochem 2018;62:2–10.
2. Evers JLH. Female subfertility. Lancet. 2002; 360(9327):151-9
3. Gnoth C, Godehardt D, Godehardt E, Frank-Herrmann P, Freundl G. Time to pregnancy: results of the German prospective study and impact on the management of infertility. Hum Reprod 2003; 18(9):1959-66.
4. Practice Committee of American Society for Reproductive Medicine. Definitions of infertility and recurrent pregnancy loss: a committee opinion. Fertil Steril 2013;99(1):63.
5. Louis JF, Thoma ME, Sørensen DN, McLain AC, King RB, Sundaram R, et al. The prevalence of couple infertility in the United States from a male perspective: evidence from a nationally representative sample. Andrology 2013; 1(5):741-8.
6. Boivin J, Bunting L, Collins JA, Nygren KG. International estimates of infertility prevalence and treatment-seeking: potential need and demand for infertility medical care. Hum Reprod 2007; 22(6):1506-12.
7. Mascarenhas MN, Flaxman SR, Boerma T, Vanderpoel S, Stevens GA. National, Regional, and Global Trends in Infertility Prevalence Since 1990: A Systematic Analysis of 277 Health Surveys. Low N, editor. PLoS Med 2012;9(12):e1001356.
8. Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. Testing and interpreting measures of ovarian reserve: a committee opinion. Fertil Steril 2015; 103(3):e9-e17.
9. ESHRE. The ESHRE Capri Workshop Group. Intrauterine insemination. Hum

- Reprod Update 2009; 15(3):265-77.
10. Allen VM, Wilson RD, Cheung A, Wilson RD, Allen VM, Blight C, et al. Pregnancy Outcomes After Assisted Reproductive Technology. J Obstet Gynaecol Can 2006; 28(3):220-233.
 11. Thonneau P, Marchand S, Tallec A, Ferial ML, Ducot B, Lansac J, et al. Incidence and main causes of infertility in a resident population (1,850,000) of three French regions (1988-1989). Hum Reprod 1991;6(6):811-6
 12. Katz DJ, Teloken P, Shoshany O. Male infertility - The other side of the equation. Aust Fam Physician. 2017;46(9):641–6.
 13. Nallella KP, Sharma RK, Aziz N, Agarwal A. Significance of sperm characteristics in the evaluation of male infertility. Fertil Steril. 2006;85(3):629–34.
 14. Gunes S, Al-Sadaan M, Agarwal A. Spermatogenesis, DNA damage and DNA repair mechanisms in male infertility. Reprod Biomed Online. 2015; 31(3):309-19.
 15. De Jonge C. Semen analysis: Looking for an upgrade in class. Fertil Steril. 2012; 97(2):260-6.
 16. Neto FT, Bach PV, Najari BB, Li PS, Goldstein M. Spermatogenesis in humans and its affecting factors. Semin Cell Dev Biol 2016; 59:10-26.
 17. Gadêlha H, Gaffney EA. Flagellar ultrastructure suppresses buckling instabilities and enables mammalian sperm navigation in high-viscosity media. J R Soc Interface. 2019; 16(152):20180668.
 18. Practice Committee of American Society for Reproductive Medicine. Diagnostic evaluation of the infertile female: a committee opinion. Fertil Steril. 2012;98(2):302-7.

19. Andrade-Rocha FT. On the Origins of the Semen Analysis: A Close Relationship with the History of the Reproductive Medicine. *J Hum Reprod Sci* 2017; 10(4):242-255
20. World Health Organization. WHO laboratory manual for the examination of human semen and semen-cervical mucus interaction, 1st edn. Singapore: Press Concern; 1980
21. World Health Organization. WHO laboratory manual for the examination of human semen and semen-cervical mucus interaction, 2nd edn. Cambridge: Cambridge University Press; 1987
22. World Health Organization. WHO laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction, 3rd edn. Cambridge: Cambridge University Press; 1992.
23. World Health Organization. WHO laboratory manual for the examination of human semen and semen-cervical mucus interaction. 4th ed. Cambridge, UK: Cambridge University Press; 1999
24. World Health Organization. WHO laboratory manual for the Examination and processing of human semen. 5th edition. Geneva, Switzerland. 2010.
25. Barratt CLR, Björndahl L, Menkveld R, Mortimer D. ESHRE special interest group for andrology basic semen analysis course: A continued focus on accuracy, quality, efficiency and clinical relevance. *Hum Reprod.* 2011;26(12):3207–12.
26. National Institute for Health and Clinical Excellence: Guidance. Fertility: Assessment and Treatment for People with Fertility Problems. NICE Clinical Guidelines, No. 156
27. Patel AS, Leong JY, Ramasamy R. Prediction of male infertility by the World

- Health Organization laboratory manual for assessment of semen analysis: A systematic review. *Arab J Urol* 2017; 16(1):96-102.
28. Esteves SC, Zini A, Aziz N, Alvarez JG, Sabanegh ES, Agarwal A. Critical appraisal of world health organization's new reference values for human semen characteristics and effect on diagnosis and treatment of subfertile men. *Urology* 2012; 79(1):16-22.
 29. Catanzariti F, Cantoro U, Lacetera V, Muzzonigro G, Polito M. Comparison between WHO (World Health Organization) 2010 and WHO 1999 parameters for semen analysis – interpretation of 529 consecutive samples. *Arch Ital di Urol e Androl.* 2013;85(3):125.
 30. Bertolla RP. Understanding the physiologic role of oxidation-reduction equilibrium in semen. *Fertil Steril* 2016;106(3):547-8.
 31. Lepine S, McDowell S, Searle LM, Kroon B, Glujovsky D, Yazdani A. Advanced sperm selection techniques for assisted reproduction. *Cochrane Database Syst Rev* 2019; 7:CD010461.
 32. Agarwal A, Sharma R, Roychoudhury S, Du Plessis S, Sabanegh E. MiOXSYS: a novel method of measuring oxidation reduction potential in semen and seminal plasma. *Fertil Steril.* 2016;106(3):566-573.e10
 33. Wyck S, Herrera C, Requena CE, Bittner L, Hajkova P, Bollwein H, et al. Oxidative stress in sperm affects the epigenetic reprogramming in early embryonic development. *Epigenetics Chromatin* 2018; 11(1):60.
 34. Butt A, Chohan MA. Comparative efficacy of density gradient and swim-up methods of semen preparation in intrauterine insemination cycles. *J Pak Med Assoc.* 2016; 66(8):932-7
 35. Palini S, Stefani S De, Primiterra M, Benedetti S, Barone S, Carli L, et al.

- Comparison of in vitro fertilization outcomes in ICSI cycles after human sperm preparation by density gradient centrifugation and direct micro swim-up without centrifugation. *JBRA Assist Reprod* 2017; 21(2):89-93
36. Jameel T. Sperm swim-up: a simple and effective technique of semen processing for intrauterine insemination. *J Pak Med Assoc* 2008;58(2):71-4.
 37. Carlsen E, Giwercman A, Keiding N, Skakkebaek NE. Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years. *BMJ* 1992;305(6854):609-13
 38. Elbardisi H, Majzoub A, Al Said S, Al Rumaihi K, El Ansari W, Alattar A, et al. Geographical differences in semen characteristics of 13 892 infertile men. *Arab J Urol* 2018;16(1):3-9.
 39. Huang C, Li B, Xu K, Liu D, Hu J, Yang Y, et al. Decline in semen quality among 30,636 young Chinese men from 2001 to 2015. *Fertil Steril* 2017; 107(1):83-88.e2
 40. Sengupta P. Current trends of male reproductive health disorders and the changing semen quality. *Int J Prev Med* 2014;5:1-5
 41. Sengupta P. Recent trends in male reproductive health problems. *Asian J Pharm Clin Res* 2014;7:1-5.
 42. Sengupta P, Nwagha U, Dutta S, Krajewska-Kulak E, Izuka E. Evidence for decreasing sperm count in african population from 1965 to 2015. *Afr Health Sci.* 2017;17(2):418–27.
 43. Shine R, Peek J, Birdsall M. Declining sperm quality in New Zealand over 20 years. *N Z Med J* 2008;121(1287):50-6.
 44. Swan SH, Brazil C, Drobnis EZ, Liu F, Kruse RL, Hatch M, et al. Geographic differences in semen quality of fertile U.S. males. *Environ Health Perspect.* 2002;111(4):414–20.

45. Levine H, Jørgensen N, Martino-Andrade A, Mendiola J, Weksler-Derri D, Mindlis I, et al. Temporal trends in sperm count: A systematic review and meta-regression analysis. *Hum Reprod Update* 2017;23(6):646–59.
46. Glina S, Nova T, Brand VBF, Molina E, Galuppo AG, Correa NR, et al. Evaluation of semen parameters in semen donors in a ten-year period in the city of São Paulo. *Einstein (Sao Paulo)* 2010; 8(4):423-9
47. Borges Jr. E, Setti AS, Braga DP de AF, Figueira R de CS, Iaconelli Jr. A. Decline in semen quality among infertile men in Brazil during the past 10 years. *Int Braz J Urol.* 2015; 41(4):757-63.
48. Antoniassi MP, Intasqui P, Camargo M, Zylbersztejn DS, Carvalho VM, Cardozo KH, Bertolla RP. Analysis of the functional aspects and seminal plasma proteomic profile of sperm from smokers. *BJU Int* 2016; 118(5):814-822.
49. Sharma R, Harlev A, Agarwal A, Esteves SC. Cigarette Smoking and Semen Quality: A New Meta-analysis Examining the Effect of the 2010 World Health Organization Laboratory Methods for the Examination of Human Semen. *Eur Urol.* 2016;70(4):635-45
50. Durairajanayagam D. Lifestyle causes of male infertility. *Arab J Urol* 2018; 16(1):10-20.
51. Pouretezari M, Talebi AR, Mangoli E, Anvari M, Rahimipour M. Additional deleterious effects of alcohol consumption on sperm parameters and DNA integrity in diabetic mice. *Andrologia.* 2016;48(5):564-9
52. Ferigolo PC, Ribeiro de Andrade MB, Camargo M, Carvalho VM, Cardozo KHM, Bertolla RP, Fraietta R. Sperm functional aspects and enriched proteomic pathways of seminal plasma of adult men with obesity. *Andrology* 2019; 7(3):341-349.

53. Sharpe RM, Skakkebaek NE. Are oestrogens involved in falling sperm counts and disorders of the male reproductive tract? *Lancet*. 1993;341(8857):1392-5.
54. Joffe M. What has happened to human fertility? *Hum Reprod*. 2010;25(2):295-307.
55. Fisch H. Declining worldwide sperm counts: disproving a myth. *Urol Clin North Am*. 2008;35(2):137-46, vii
56. Hamilton JA et al. Total motile sperm count: a better indicator for the severity of male factor infertility than the WHO sperm classification system. *Hum Reprod*. 30(5),1110-21 (2015).
57. Freitas MJ, Vijayaraghavan S, Fardilha M. Signaling mechanisms in mammalian sperm motility. *Biol Reprod* 2017; 96(1):2-12.
58. Van Weert JM, Repping S, Van Voorhis BJ, Van Der Veen F, Bossuyt PMM, Mol BWJ. Performance of the postwash total motile sperm count as a predictor of pregnancy at the time of intrauterine insemination: A meta-analysis. *Fertil Steril*. 2004;82(3):612–20.
59. Tiegs AW, Landis J, Garrido N, Scott RT, Hotaling JM. Total motile sperm count trend over time: Evaluation of semen analyses from 119,972 men from subfertile couples. *Urology* 2019;132:109-116.
60. Centola GM, Blanchard A, Demick J, Li S, Eisenberg ML. Decline in sperm count and motility in young adult men from 2003 to 2013: observations from a U.S. sperm bank. *Andrology* 2016; 4(2):270-6
61. Spingart C, Frapsauce C, Veau S, Barthélémy C, Royère D, Guérif F. Semen variation in a population of fertile donors: evaluation in a French centre over a 34-year period. *Int J Androl* 2012; 35(3):467-74
62. Saacke RG. Sperm morphology: Its relevance to compensable and uncompensable traits in semen. *Theriogenology* 2008; 70(3):473-8.

63. Menkveld R. Clinical significance of the low normal sperm morphology value as proposed in the fifth edition of the WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen. *Asian J Androl* 2010; 12(1):47-58.
64. Goldenberg M, Rabinovici J, Bider D, Lunenfeld B, Blankstein J, Weissenberg R. Intra-uterine insemination with prepared sperm vs. unprepared first split ejaculates. A randomized study. *Andrologia* 1992; 24(3):135-40.
65. Mostafa T. Cigarette smoking and male infertility. *J Adv Res* 2010;1(3):179–86.
66. Yu B, Qi Y, Liu D, Gao X, Chen H, Bai C, Huang Z. Cigarette smoking is associated with abnormal histone-to-protamine transition in human sperm. *Fertil Steril* 2014;101(1):51-57.e1.
67. Borges E Jr, Braga DPAF, Provenza RR, Figueira RCS, Iaconelli A Jr, Setti AS. Paternal lifestyle factors in relation to semen quality and in vitro reproductive outcomes. *Andrologia* 2018; 50(9):e13090.
68. Ricci E, Al Beitawi S, Cipriani S, Candiani M, Chiaffarino F, Viganò P, et al. Semen quality and alcohol intake: a systematic review and meta-analysis. *Reprod Biomed Online* 2017;34(1):38–47
69. Adams JA, Galloway TS, Mondal D, Esteves SC, Mathews F. Effect of mobile telephones on sperm quality: A systematic review and meta-analysis. *Environ Int* 2014; 70:106-12.
70. Ribeiro ALP, Duncan BB, Brant LCC, Lotufo PA, Mill JG, Barreto SM. Cardiovascular Health in Brazil: Trends and Perspectives. *Circulation* 2016; 133(4):422-33
71. Mohr BA, Bhasin S, Link CL, O'Donnell AB, McKinlay JB. The effect of changes in adiposity on testosterone levels in older men: longitudinal results from the Massachusetts Male Aging Study. *Eur J Endocrinol* 2006; 155(3):443-52

72. Sermondade N, Faure C, Fezeu L, Shayeb AG, Bonde JP, Jensen TK, et al. BMI in relation to sperm count: an updated systematic review and collaborative meta-analysis. *Hum Reprod Update* 2013; 19(3):221-31
73. Baker K, Li J, Sabanegh E. Analysis of semen parameters in male referrals: impact of reference limits, stratification by fertility categories, predictors of change, and comparison of normal semen parameters in subfertile couples. *Fertil Steril* 2015; 103(1):59-65.e5.
74. Colasante A, Minasi MG, Scarselli F, Casciani V, Zazzaro V, Ruberti A, et al. The aging male: Relationship between male age, sperm quality and sperm DNA damage in an unselected population of 3124 men attending the fertility centre for the first time. *Arch Ital di Urol Androl organo Uff [di] Soc Ital di Ecogr Urol e Nefrol.* 2019;90(4):254–9.
75. Almeida S, Rato L, Sousa M, Alves MG, Oliveira PF. Fertility and Sperm Quality in the Aging Male. *Curr Pharm Des* 2017; 23(30):4429–37
76. Kaarouch I, Bouamoud N, Madkour A, Louanjli N, Saadani B, Assou S, et al. Paternal age: Negative impact on sperm genome decays and IVF outcomes after 40 years. *Mol Reprod Dev* 2018;85(3):271–80.

8. ANEXOS

Anexo 1 - Comissão de Pesquisa do CAISM

Comissão de Pesquisa
CAISM/UNICAMP

PARECER CONSUBSTANCIADO DE PROJETO DE PESQUISA ANALISADO PELA COMISSÃO DE PESQUISA/CAISM/UNICAMP

IDENTIFICAÇÃO		
1. Título do Projeto: "Análise retrospectiva dos espermogramas realizadas		
2. Pesquisador Responsável: Luiz Francisco Cintra Baccaro		
3. Instituição do Pesquisador: Departamento de Tocoginecologia - Faculdade de Ciências Médicas - Unicamp		
4. Local onde será realizada a Pesquisa: Hospital da Mulher Prof. Dr. José Aristodemo Pinotti - Divisão de Obstetrícia		
5. Nº de inscrição no CEP/FCM: /201	6. Grupo:	7. Data de apresentação ao CEP: / /201

APRESENTAÇÃO DO PROJETO:

8. Introdução: a infertilidade é reconhecida desde 2012 pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como doença e um problema de saúde pública, podendo ser provocada por diversos fatores, femininos e/ou masculinos. Em quase metade dos casos de infertilidade há pelo menos um fator masculino associado. Diversas causas podem gerar alterações seminais, entre elas drogas, álcool, qualidade de vida e até mesmo a idade do homem. Objetivos: Avaliar a influência da idade do homem e do ano de coleta do exame sobre os diversos parâmetros seminais de homens investigados por infertilidade conjugal. Observar a influência de dois critérios de classificação de normalidade para encaminhamento do homem para avaliação especializada. Métodos: Será realizado um estudo retrospectivo descritivo para descrever e comparar a variação nos parâmetros seminais antes e após a capacitação espermática em homens que realizaram espermograma no Hospital da Mulher Prof. Dr. José Aristodemo Pinotti CAISM/UNICAMP no período de janeiro de 1989 a dezembro de 2016. Com isso, devem ser analisados aproximadamente 31000 exames. Análise estatística: Primeiramente, será realizada uma análise estatística descritiva dos dados e os resultados dos espermograma serão categorizados em três grupos, alterado (qualquer parâmetro com valores abaixo dos limites de normalidade da OMS 2010); intermediário (qualquer parâmetro com valores acima dos limites de normalidade da OMS 2010, porém abaixo dos limites de normalidade da OMS 1999); normal (todos os parâmetros com valores acima dos limites de normalidade da OMS 1999). Posteriormente, para testar a influência da idade sobre cada um dos parâmetros do espermograma tanto antes como após a capacitação espermática os exames serão categorizados em faixas etárias e será realizado teste ANOVA ou Kruskal-Wallis dependendo da normalidade da distribuição dos dados. Para os parâmetros do sêmen que se relacionarem significativamente com as faixas etárias, será realizada regressão linear para definição do ponto de mudança. Para testar a influência do ano de coleta do espermograma sobre os parâmetros seminais será realizada regressão polinomial tanto para a totalidade dos exames quanto para os exames categorizados por faixa etária. O nível de significância será assumido em 5%.

AValiação DOS RISCOS E BENEFÍCIOS:

9. Trata-se de um estudo retrospectivo com levantamento de espermogramas realizados no período de 1989 a 2016 e disponíveis em base de dados do serviço onde será realizado o estudo. Não há riscos ou benefícios diretos aos sujeitos incluídos. Os benefícios relacionam-se a melhorar o conhecimento do fator masculino na infertilidade conjugal.

COMENTÁRIOS E CONSIDERAÇÕES SOBRE A PESQUISA:

10. Pretende incluir e avaliar grande número de resultados de espermogramas, com análise da influência da idade sobre os parâmetros analisados, bem como alterações ao longo dos anos sobre o fator masculino.

CONSIDERAÇÕES SOBRE OS TERMOS DE APRESENTAÇÃO OBRIGATÓRIA:

11. Incluídos e adequadamente descritos os objetivos e hipóteses. Metodologia clara. Solicita dispensa

do termo de consentimento pela dificuldade de localização dos sujeitos ao longo dos anos. Garante sigilo e privacidade dos sujeitos.

RECOMENDAÇÕES:

12. Aprovado

CONCLUSÕES OU PENDÊNCIAS E LISTA DE INADEQUAÇÕES:

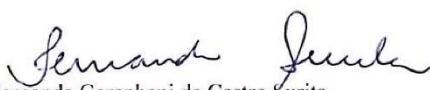
13.

14. SITUAÇÃO DO PARECER:

☒ Aprovado ☐ Não Recomenda a Aprovação ☐ Em Pendência ☐ Com Destaque

Campinas, 5 de setembro de 2016.

Nome e assinatura do(s) membro(s) relator(es):


Prof.ª. Dr.ª. Fernanda Garanhani de Castro Surita
Presidente da Comissão de Pesquisa - DTG/CAISM/Unicamp

Anexo 2 – Aprovação do projeto no CEP – UNICAMP



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: Análise retrospectiva dos espermogramas realizados no CAISM-UNICAMP entre 1989 e 2018

Pesquisador: Luiz Francisco Cintra Baccaro

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

Versão: 2

CAAE: 59911516.5.0000.5404

Instituição Proponente: Hospital da Mulher Prof. Dr. José Aristodemo Pinotti - CAISM

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.839.807

Apresentação do Projeto:

Resumo: A fertilidade é definida como a capacidade de se gerar descendentes viáveis (1). Alguns autores definem como fertilidade normal, a capacidade de se obter uma concepção espontânea em até 12 ciclos subsequentes, ou seja, casais férteis seriam capazes de engravidar em até um ano de relações sexuais regulares e desprotegidas de anticoncepcionais (1). Estima-se que 75% dos casais férteis consigam engravidar nos primeiros 3 ciclos de tentativas e que ao final dos primeiros 6 meses 80% deles conseguirão obter uma gravidez clínica (2). A infertilidade é reconhecida desde 2012 pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como uma doença conjugal. Sendo definida como a falha na obtenção de uma gravidez bem-sucedida no prazo de um ano por casais em idade fértil que mantenham relações sexuais frequentes e regulares e sem uso de nenhum método contraceptivo. A infertilidade acomete cerca de 8 a 15% dos casais que desejam a maternidade, podendo gerar consequências físicas e psicológicas, como depressão, estagnação social, sofrimento psicológico e o surgimento de outras doenças, tanto em mulheres quanto em homens, e portanto é considerada um problema de saúde pública, possuindo no Brasil atendimento inclusive no Sistema Único de Saúde (SUS) (2). A infertilidade pode ser decorrente de diversos

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126

Bairro: Barão Geraldo

CEP: 13.083-887

UF: SP

Município: CAMPINAS

Telefone: (19)3521-8936

Fax: (19)3521-7187

E-mail: cep@fcm.unicamp.br



UNICAMP - CAMPUS
CAMPINAS



Continuação do Parecer: 2.839.807

fatores ou patologias, tanto femininas quanto masculinas. As causas mais comuns são baixa reserva ovariana; disfunção ovulatória; fatores relacionados à anatomia uterina; fatores tuboperitoniais; fatores masculinos; e infertilidade sem causa aparente (3). O tratamento para a infertilidade depende do seu fator predisponente. Em casos de melhor prognóstico, como a infertilidade decorrente de disfunção ovulatória, podem ser indicadas técnicas de reprodução assistida de baixa complexidade, dentre elas, a inseminação intrauterina (IIU) é utilizada com maior frequência. A IIU consiste basicamente em uma técnica de aproximação de gametas, com o objetivo de facilitar a chegada dos espermatozoides às tubas uterinas no momento oportuno após a ovulação (4). Não demanda procedimentos cirúrgicos ou manipulação de embriões, o que contribui para um menor custo final (6). Em casos de infertilidade decorrente de fatores de pior prognóstico são indicadas técnicas de reprodução assistida de alta complexidade, como a fertilização in vitro (FIV). Na FIV a fertilização do óvulo pelo espermatozoide é realizada no laboratório. O embrião resultante do procedimento é mantido em incubação geralmente até o 3º-5º de desenvolvimento para posterior transferência para o útero materno. Portanto são necessários técnicas, equipamentos e ambientes mais elaborados, agregando maior custo para o procedimento (4). Estudos demonstram que de 30% a 40% dos casos de infertilidade possuem ao menos um fator masculino associado, e que cerca de 20% casos têm como causa única o fator masculino (5). Os fatores masculinos que podem causar infertilidade vão desde a completa ausência de espermatozoides no sêmen (azoospermia), até alterações em outros parâmetros seminais como baixa concentração, alterações na morfologia, vitalidade ou motilidade dos espermatozoides. O exame responsável por tais diagnósticos é o espermograma, realizado após coleta do sêmen por masturbação em frasco estéril e posterior análise de parâmetros macroscópicos, como volume de sêmen ejaculado, sua viscosidade e pH, e parâmetros microscópicos como concentração de espermatozoides por mililitro de ejaculado, grau de motilidade dos espermatozoides, além da avaliação de sua vitalidade e morfologia (6). Resultados fora do intervalo de referência estabelecido pela OMS caracterizam uma possível causa de infertilidade (6). Uma etapa posterior às análises do espermograma essencial na preparação do sêmen para as técnicas de reprodução assistida, mas também amplamente utilizada como complemento diagnóstico no espermograma, é a capacitação espermática. Ela consiste na retirada do plasma seminal por meio de lavagens com meio de cultura associada a ciclos de centrifugação, e na capacitação do espermatozoide para a fecundação, evento que in vivo seria realizado principalmente pelo muco vaginal. No plasma seminal existem substâncias que podem prejudicar o processo de fecundação, como os radicais livres. Além disso, são removidos espermatozoides

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo CEP: 13.083-887
UF: SP Município: CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 Fax: (19)3521-7187 E-mail: cep@fcm.unicamp.br



UNICAMP - CAMPUS
CAMPINAS



Continuação do Parecer: 2.839.807

mortos e outras células não germinativas como os leucócitos (6). De acordo com a OMS, o processamento seminal ou capacitação espermática pode ser realizado por três diferentes métodos. A lavagem simples é a técnica mais barata e de menor complexidade. Trata-se de duas lavagens do sêmen seguidas de centrifugação, sendo a menos eficaz, e sugerida apenas para os pacientes em que todos os parâmetros seminais são normais. A técnica do gradiente descontínuo de densidade promove a separação dos componentes seminais baseado em suas densidades. Apresenta maior custo e complexidade, porém seu uso é mais abrangente. A técnica de swim -up possui um custo relativamente baixo, por isso é a técnica mais utilizada pelos hospitais e laboratórios públicos que oferecem o serviço. O sêmen, após passar pelos dois ciclos de lavagem e centrifugação, é colocado no fundo de um tubo de ensaio contendo meio de cultura e este tudo é mantido inclinado a 45° por uma hora. Os espermatozoides mais aptos se locomovem pelo meio de cultura até a porção superior do tubo, promovendo desta forma uma seleção dos melhores gametas (6). Os parâmetros seminais podem ser influenciados por diversos fatores como uso abusivo de álcool, drogas, estresse, período de abstinência antes da coleta, a qualidade de vida e até mesmo a idade do homem (7-10). Embora a influência de alguns desses fatores já esteja bem estabelecida, outros, como a idade do homem e a qualidade de vida, continuam sendo questionados, e cada vez mais estudos tentam minimizar vieses a fim de se chegar a uma conclusão sólida. Alguns estudos têm demonstrado que a qualidade seminal vem decaindo ao longo das últimas décadas, e atribuem isso a fatores como toxinas no ambiente devido a poluição, influências étnicas e geográficas, além de aumento das anomalias congênitas no trato urogenital (9, 11-13). Outros fatores não relacionados ao ambiente também podem estar implicados nessa queda da qualidade seminal como ausência de abstinência sexual antes da coleta, diferentes técnicas utilizadas para realização do exame, além de uma maior idade dos homens que buscam avaliação por infertilidade atualmente (9, 11). Embora a fertilidade masculina não decaia com o passar dos anos de maneira tão intensa quanto a feminina, muitos estudos vêm mostrando que há sim uma queda na qualidade do esperma com o aumento da idade e que isso pode comprometer a fertilidade do homem. Stone et al. (7) demonstram que a partir dos 34 anos de idade a qualidade do sêmen começa a sofrer as primeiras alterações. Há uma redução tanto do número de espermatozoides com motilidade progressiva, quanto do número total de espermatozoides no ejaculado, o que pode reduzir a probabilidade de gravidez. Após os 40 anos a concentração de espermatozoides e a porcentagem de espermatozoides com morfologia normal também sofrem alterações, sendo que após os 55 anos há um comprometimento mais acentuado da qualidade seminal (7). Pasqualotto et al (14) em 2005 já haviam demonstrado uma queda tanto na

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126

Bairro: Barão Geraldo

CEP: 13.083-887

UF: SP

Município: CAMPINAS

Telefone: (19)3521-8936

Fax: (19)3521-7187

E-mail: cep@fcm.unicamp.br



UNICAMP - CAMPUS
CAMPINAS



Continuação do Parecer: 2.839.807

concentração seminal quanto na motilidade dos espermatozoides a partir dos 45 anos. Acredita-se que esta queda na qualidade seminal está relacionada com o aumento dos radicais livres e aumento nos níveis de hormônio folículo estimulante que ocorrem principalmente após os 40 anos (7). Entretanto alguns pesquisadores demonstraram que a qualidade espermática não é inversamente proporcional a idade, e que sua queda não ocorre de maneira linear. Levitas et al (15), demonstram em seu estudo que embora a qualidade seminal apresente um comprometimento a partir dos 55 anos, a queda nos parâmetros seminais não é proporcional ao aumento da idade. Neste estudo os homens que apresentaram melhores características seminais tinham entre 30 e 35 anos. Muitas vezes a escolha de se encaminhar ou não um homem para avaliação especializada é tomada por profissionais com pouca experiência em infertilidade masculina. Com isso, os valores de referência do exame de espermograma são os principais parâmetros utilizados para guiar a decisão (16). Em 2010 a Organização Mundial de Saúde divulgou novos valores de referência (6) para análise do espermograma em substituição aos valores de referência utilizados pela mesma instituição em 1999 (17). Esses novos valores de referência são mais complacentes que os anteriores. Segundo os critérios de 1999, para ser considerado normal um homem tinha que ter uma concentração de espermatozoides no sêmen 20 milhões/ml e uma porcentagem de espermatozoides com motilidade progressiva > 50%. Segundo os critérios de 2010, para ser considerado normal o homem tem que ter uma concentração de espermatozoides no sêmen 15 milhões/ml e uma porcentagem de espermatozoides com motilidade progressiva > 32%. Algumas críticas podem ser feitas aos novos valores de referência publicados pela OMS. A primeira é que são derivados de uma população de homens sabidamente férteis e, portanto, não representaria a população de homens inférteis. A segunda é de que o ponto de referência de normalidade foi estabelecido como o quinto percentil da distribuição da população de homens férteis, e que esse ponto de corte não tem relação conhecida com a fertilidade (16). Alguns autores têm publicado estudos comparando a classificação dos homens realizada pelos dois critérios de avaliação do espermograma. Baker et al demonstraram que 16% dos pacientes considerados normais de acordo com as referências da OMS 2010 possuíam alguma alteração segundo a OMS 1999 (16). Murray et al.(18), observaram efeito similar em seu estudo onde 15% dos pacientes avaliados mudaram de categoria com a nova referência. Possivelmente, homens subférteis podem deixar de ser avaliados por especialistas se os únicos critérios utilizados para o encaminhamento forem os novos parâmetros de normalidade do espermograma. A proposta deste projeto é obter um melhor conhecimento sobre a influência da idade nos parâmetros seminais não só nos espermogramas diagnósticos, mas também após a capacitação

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo CEP: 13.083-887
UF: SP Município: CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 Fax: (19)3521-7187 E-mail: cep@fcm.unicamp.br



Continuação do Parecer: 2.839.807

espermática, que é uma importante etapa nas técnicas de reprodução assistida. Além disso, poderá ser observado se tem ocorrido alteração na qualidade seminal nos últimos 27 anos, e os resultados dos exames poderão ser comparados utilizando os critérios de referência publicados pela OMS em 1999 e 2010.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário: Avaliar a influência da idade do homem e do ano de coleta do exame sobre os parâmetros seminais de homens investigados por infertilidade conjugal no período de 1989 a julho de 2018 no Hospital da Mulher Prof. Dr. José Aristodemo Pinotti CAISM/UNICAMP.

Objetivo Secundário:

3.2.1. Analisar a influência da idade do homem sobre o volume de esperma, o pH, a viabilidade, a motilidade, a morfologia, a presença de leucospermia, a concentração de espermatozoides e a contagem total de espermatozoides antes da capacitação espermática

3.2.2. Analisar a influência da idade do homem sobre a motilidade, a concentração de espermatozoides e a contagem total de espermatozoides após a capacitação espermática

3.2.3. Descrever e comparar o volume de esperma, o pH, a viabilidade, a motilidade, a morfologia, a presença de leucospermia, a concentração de espermatozoides e a contagem total de espermatozoides antes da capacitação espermática em pacientes com a mesma faixa etária nos últimos 27 anos

3.2.4. Descrever e comparar a motilidade, a concentração de espermatozoides e a contagem total de espermatozoides após a capacitação espermática em pacientes com a mesma faixa etária nos últimos 27 anos

3.2.5. Descrever a frequência de homens que seriam considerados portadores de alteração do espermograma segundo os critérios da Organização Mundial da Saúde de 1999 e segundo os critérios da Organização Mundial da Saúde de 2010 durante todo o período analisado.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: Não apresenta riscos previsíveis.

Benefícios: Não tem benefício direto para o participante. Os resultados do presente estudo poderão ajudar a esclarecer a influência da idade do homem sobre os parâmetros seminais. Além disso poderão ser analisadas possíveis alterações na qualidade do sêmen nos últimos 27 anos e observada a influência de dois critérios de classificação de normalidade para encaminhamento do homem para avaliação especializada.

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887
UF: SP **Município:** CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@fcm.unicamp.br



UNICAMP - CAMPUS
CAMPINAS



Continuação do Parecer: 2.839.807

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Esta versão é emenda ao projeto aprovado pelo parecer consubstanciado CEP .o 1.760.090 de 04/10/2016 com a seguinte justificativa: "Encaminhamento de emenda ao projeto de pesquisa intitulado "Análise retrospectiva dos espermogramas realizados no CAISM-UNICAMP entre 1989 e 2016". O projeto foi concluído com êxito em julho de 2017 e serviu como base para defesa de mestrado da aluna Anne Caroline Ropelle. Os resultados foram apresentados em evento científico no exterior. Planejamos realizar uma nova análise dos dados utilizando um novo parâmetro recém-descrito para análise de espermogramas. Com o intuito de que os dados continuem atualizados, gostaríamos de analisar também os espermogramas realizados no ano de 2017 e no primeiro semestre do ano de 2018. Pretendemos utilizar essa nova análise para a defesa da dissertação de mestrado da aluna Samyra Siqueira, regularmente inscrita no Programa de Pós-graduação em Tocoginecologia. Com isso, solicito autorização para analisar os espermogramas realizados no Laboratório de Reprodução Humana do CAISM-UNICAMP no período de 01/01/2017 a 30/06/2018, mantendo o desenho do projeto aprovado por este Comitê de Ética em Pesquisa em 04/10/2016."

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Nesta versão foram anexados:

- 1- PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_1190730_E1.pdf
- 2- Projeto de pesquisa modificado.pdf
- 3- relatorio parcial.docx
- 4- carta ao cep.docx

Solicita dispensa do TCLE com a justificativa: "Como a pesquisa é retrospectiva, envolvendo apenas a revisão de dados de banco informatizado que não implica em intervenções e não" compromete a privacidade dos sujeitos, solicita-se a dispensa de assinatura de termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE)."

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Aprovada a análise dos espermogramas realizados no Laboratório de Reprodução Humana do CAISM-UNICAMP no período de 01/01/2017 a 30/06/2018, mantendo o desenho do projeto aprovado por este Comitê de Ética em Pesquisa em 04/10/2016 e a inclusão da aluna de mestrado Samyra Siqueira como membro da equipe de pesquisa.

Verificamos que os relatórios parciais não foram apresentados, sendo que os mesmos devem ser apresentados anualmente ao CEP a partir da data de aprovação, conforme descrito na resolução CNS/MS 466/12 item II.20 e XI.2 letra "d". Solicitamos que o pesquisador submeta o relatório

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo CEP: 13.083-887
UF: SP Município: CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 Fax: (19)3521-7187 E-mail: cep@fcm.unicamp.br



UNICAMP - CAMPUS
CAMPINAS



Continuação do Parecer: 2.639.807

parcial (através notificação) junto a Plataforma Brasil.

Considerações Finais a critério do CEP:

- O participante da pesquisa deve receber uma via do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (quando aplicável).

- O participante da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (quando aplicável).

- O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado. Se o pesquisador considerar a descontinuação do estudo, esta deve ser justificada e somente ser realizada após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou. O pesquisador deve aguardar o parecer do CEP quanto à descontinuação, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao participante ou quando constatar a superioridade de uma estratégia diagnóstica ou terapêutica oferecida a um dos grupos da pesquisa, isto é, somente em caso de necessidade de ação imediata com intuito de proteger os participantes.

- O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo. É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

- Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas e aguardando a aprovação do CEP para continuidade da pesquisa. Em caso de projetos do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma, junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial.

- Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, inicialmente seis meses após a data deste parecer de aprovação e ao término do estudo.

- Lembramos que segundo a Resolução 466/2012, item XI.2 letra e, "cabe ao pesquisador apresentar dados solicitados pelo CEP ou pela CONEP a qualquer momento".

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo CEP: 13.083-887
UF: SP Município: CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 Fax: (19)3521-7187 E-mail: cep@fcm.unicamp.br



Continuação do Parecer: 2.839.807

-O pesquisador deve manter os dados da pesquisa em arquivo, físico ou digital, sob sua guarda e responsabilidade, por um período de 5 anos após o término da pesquisa.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_1190730_E1.pdf	07/08/2018 20:01:07		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projetodepesquisamodificado.pdf	07/08/2018 20:00:21	Luiz Francisco Cintra Baccaro	Aceito
Outros	relatorioparcial.doc	31/07/2018 15:52:03	Luiz Francisco Cintra Baccaro	Aceito
Outros	cartaaocep.docx	31/07/2018 15:51:32	Luiz Francisco Cintra Baccaro	Aceito
Outros	identidadefuncional.pdf	09/09/2016 19:40:12	Luiz Francisco Cintra Baccaro	Aceito
Outros	parecerconsustanciado.pdf	08/09/2016 11:59:18	Luiz Francisco Cintra Baccaro	Aceito
Folha de Rosto	folhaderosto.pdf	30/08/2016 08:34:30	Luiz Francisco Cintra Baccaro	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projetodepesquisa.pdf	29/08/2016 12:17:21	Luiz Francisco Cintra Baccaro	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

CAMPINAS, 23 de Agosto de 2018

Assinado por:
Renata Maria dos Santos Celeghini
(Coordenador)

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo CEP: 13.083-887
UF: SP Município: CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 Fax: (19)3521-7187 E-mail: cep@fcm.unicamp.br