

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

**COMPARAÇÃO ENTRE OS CRITÉRIOS DE ANÁLISE SEMINAL DA OMS DE  
1999 E DE 2010 E CONTAGEM TOTAL DE ESPERMATOZOIDES MÓVEIS.**

PATRÍCIA DE MORAES DE ZORZI

Porto Alegre

2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

**COMPARAÇÃO ENTRE OS CRITÉRIOS DE ANÁLISE SEMINAL DA OMS DE  
1999 E DE 2010 E CONTAGEM TOTAL DE ESPERMATOZOIDES MÓVEIS.**

PATRÍCIA DE MORAES DE ZORZI

Orientadora: Profa. Dra. Helena von Eye Corleta

Dissertação apresentada como requisito parcial  
para obtenção do título de Mestre em Medicina:  
Ciências Médicas, da Universidade Federal do Rio  
Grande do Sul, Programa de Pós- Graduação em  
Medicina: Ciências Médicas.

Porto Alegre

2016

*BANCA EXAMINADORA*

Profa. Dra Anita Pimentel

Profa. Dra. Edimarlei Gonsales Valério

Prof. Dr. Edison Capp

Prof. Dr. Vanderlei Biolchi

## DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Luiz Jahir e Soraya, pela dedicação incondicional em proporcionar uma boa educação a mim e meus irmãos e pelo constante estímulo e vibração com nossas conquistas.

Ao meu marido, Cristian, por estar ao meu lado em todos os momentos importantes da minha formação.

À minha irmã, Lízia, pelo exemplo de aluna e hoje professora estudiosa e dedicada e ao meu irmão, Pedro, pelo estímulo e pela disponibilidade em ajudar sempre.

À Queri, por ser uma companheira incondicional em todos os momentos inclusive nas horas dedicadas a elaboração deste trabalho.

## **AGRADECIMENTOS**

À minha orientadora, Profa. Dra. Helena von Eye Corleta, pelo exemplo de profissional correta e competente com importante participação na minha formação como ginecologista e pelo estímulo à pesquisa e incansável disponibilidade em me orientar nesse trabalho.

À Ana Paula de Souza Kussler, pela disponibilidade e pelo auxílio imprescindível para a concretização do trabalho.

Aos pacientes e a todos, que de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

## RESUMO

**Introdução:** Em torno de 15% dos casais apresentam o diagnóstico de infertilidade, sendo que 50% se devem a fatores masculinos. Diversos testes de função espermática são propostos para a avaliação da fertilidade, mas o espermograma é o principal exame para o diagnóstico de infertilidade masculina. O valor prognóstico das características seminais como concentração, morfologia e motilidade como marcadores de infertilidade masculina é confundido. A avaliação desses e a classificação quanto à normalidade dos mesmos permanece sendo tema de discussão frequente.

**Objetivos:** Comparar as diferentes classificações de parâmetros seminais (OMS 1999, OMS 2010 e TMSC) e avaliar as características de pacientes em terapia de reprodução humana assistida que se relacionam com esses parâmetros.

**Métodos:** Foi realizado estudo longitudinal, retrospectivo, baseado em revisão de banco de dados para avaliar as características e parâmetros seminais e comparar as mesmas conforme as classificações da OMS de 1999, OMS de 2010 e TMSC de 477 homens submetidos a investigação de infertilidade ou tratamentos de reprodução assistida na clínica Generar – Reprodução Humana, entre 2011 e 2015.

**Resultados:** 401 pacientes tiveram alguma alteração pela OMS 1999, 223 pela OMS 2010 e 200 pela TMSC. O critério que mais alterou a condição de uma amostra seminal de anormal em 1999 para normal em 2010 foi a morfologia.

**Conclusão:** Os parâmetros se tornaram menos rígidos de 1999 para 2010 alterando significativamente a proporção de indivíduos que deixaram de ser classificados como inférteis. A classificação baseada no TMSC pode ser útil na indicação de alguns

tratamentos, mas não pode definir um indivíduo como fértil ou infértil em função de não levar em consideração a morfologia espermática.

**Palavras-chave:** *Male Fertility; Semen Analysis; Seminal Parameters; Sperm Function*

### **ABSTRACT**

**Background:** Approximately 15% of couples presenting the diagnosis of infertility, and 50% of cases are due to male factors. Several sperm function testing is proposed for the evaluation of male fertility, but sperm is the first test for the diagnosis of male infertility causes. The prognostic value of the seminal characteristics as concentration, morphology and motility as male infertility markers is often confused. Evaluation of semen parameters and classification for normality remains frequent topic of discussion.

**Objectives:** Compare the different classifications of seminal parameters (OMS 1999, WHO 2010 and TMSC) and evaluate the characteristics of patients treated in assisted reproduction therapy relating to these parameters.

**Methods:** Retrospective study based on chart review evaluated 477 semen samples from men undergoing investigation or infertility treatments in assisted reproduction between 2011 and 2015.

**Results:** 401 patients were considered abnormal by the WHO 1999, 223 by WHO 2010 and 200 for TMSC. The criteria that most changed the classification was sperm morphology.

**Conclusion:** The parameters have become less rigid 1999 to 2010 significantly changing the proportion of individuals who are no longer classified as infertile. The classification based on TMSA can't define an individual as fertile or infertile regardless due to not take into account the sperm morphology, but may be helpful when it comes to the indication of the intrauterine insemination.

**Keywords:** *Male Fertility; Semen Analysis; Seminal Parameters; Sperm Function*



## LISTA DE FIGURAS DO ARTIGO

Figura 1- Parâmetros OMS de acordo com os critérios de 1999 e 2010.

Figura 2- Avaliação das amostras que apresentaram alteração por 1999 e sua situação pelo critério de 2010.

## LISTA DE TABELAS DO ARTIGO

Tabela 1 – Caracterização da amostra.

Tabela 2 – Dados das amostras seminais.

Tabela 3 – Diferenças nas alterações dos parâmetros entre as classificações OMS de 1999 e 2010.

Tabela 4 – Alterações nas 477 amostras analisadas conforme as classificações da OMS de 1999 e 2010.

Tabela 5 – Associação entre TMSC e as alterações nas classificações OMS 1999 e 2010.

Tabela 6 – Associações significativas com alterações de motilidade, morfologia, volume, vitalidade e geral (pelo menos um critério).

**LISTA DE ABREVIATURAS**

ESHRE	Sociedade Europeia de Reprodução Humana e Embriologia
FSH	Hormônio Folículo Estimulante
HAS	Hipertensão Arterial Sistêmica
HCG	Gonadotrofina Coriônica Humana
IIU	Inseminação Intrauterina
IMC	Índice de Massa Corporal
LH	Hormônio Luteinizante
OMS	Organização Mundial da Saúde
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio
TMSC	Contagem Total de Espermatozoides Móveis
FIV	Fertilização <i>In vitro</i>

## ÍNDICE

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	10
<b>2. REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	12
2.1. ESTRATÉGIA PARA LOCALIZAR E SELECIONAR A INFORMAÇÃO.....	12
2.2. AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS SEMINAIS.....	13
2.2.1. Classificações Seminais.....	14
2.2.1.1. OMS 1999.....	17
2.2.1.2. OMS 2010.....	17
2.2.1.3. TMSC.....	18
2.2.2. Estresse Oxidativo.....	20
2.2.3. Estilo de Vida.....	22
2.2.3.1. Tabagismo.....	23
2.2.3.2. Obesidade.....	24
2.2.4. Comorbidades.....	25
2.2.5. Inseminação Intrauterina e Parâmetros Seminais.....	27
<b>3. MARCO TEÓRICO</b> .....	29
<b>4. JUSTIFICATIVA</b> .....	30
<b>5. OBJETIVOS</b> .....	31
5.1. OBJETIVO PRIMÁRIO.....	31
5.2. OBJETIVOS SECUNDÁRIOS.....	31
<b>6. REFERÊNCIAS</b> .....	32
<b>7. ARTIGO</b> .....	37
<b>8. CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	59
<b>9. PERSPECTIVAS FUTURAS</b> .....	59
<b>10. ANEXOS</b> .....	60

## 1 INTRODUÇÃO

O espermatozoide foi descrito pela primeira vez em 1678 por Antoni van Leeuwenhoek e seu assistente Johannes Ham na Holanda. Mais de 100 anos após, em 1784, o fisiologista italiano, Lazzaro Spallanzani, realizou a primeira inseminação artificial em um cão com o nascimento de filhotes 62 dias após. Em 1770, em Londres, foi documentada a primeira inseminação artificial em humanos. O procedimento foi realizado por John Hunter, através da injeção de sêmen de um paciente com hipospádia severa na vagina de uma mulher (OMBELET, 2015).

Atualmente, a inseminação artificial intrauterina (IIU) com sêmen homólogo (do parceiro) é utilizada para promover a concepção de casais com infertilidade sem causa aparente ou fator masculino leve e a inseminação com sêmen de doador tem sido utilizada para casais com infertilidade masculina grave com ou sem azoospermia ou para evitar algumas doenças genéticas bem como tem sido utilizada também para casais homoafetivos ou mulheres solteiras que desejam gestar (OMBELET, 2015).

Aproximadamente 15% dos casais apresentam o diagnóstico de infertilidade, sendo que 50% dos casos se devem a fatores masculinos (JAROW, 2002). Segundo publicação de 2014 de estudo realizado com a Sociedade Europeia de Reprodução Humana e Embriologia (ESHRE), que revisou os tratamentos realizados em 2010 em países europeus, aproximadamente 176.512 ciclos de IIU foram reportados por 23 países europeus. A maioria ocorreu na França, Itália e Espanha. A média de nascimentos por ciclo foi de 8.9% nas inseminações sem doação. Para os tratamentos de IIU com sêmen de doador, 38.124 ciclos foram reportados por 20 países sendo a maioria da Dinamarca, França, Espanha e Reino Unido. A taxa de nascimentos por ciclo nesses casos foi de 13.8% (KUPKA, 2014).

Diversos testes de função espermática são propostos para a avaliação da fertilidade, mas o espermograma é o principal exame para o diagnóstico de infertilidade masculina (TALWAR, 2015; ZHANG, 2014). A análise seminal é imprescindível na investigação inicial de casais inférteis, mas seus resultados são frequentemente tidos como absolutos na habilidade de promover uma gestação. Essa análise promove a informação do estado dos túbulos seminíferos, epidídimo e glândulas sexuais acessórias. O valor prognóstico das características seminais como concentração, morfologia e motilidade como marcadores de infertilidade masculina é confundido frequentemente. O potencial de fertilidade masculino é influenciado pela atividade sexual, pelo funcionamento das glândulas acessórias e por outras condições. A análise seminal de rotina isoladamente apresenta suas limitações e não leva em consideração outras causas de infertilidade masculina como disfunções espermáticas com cromatina imatura ou danos no DNA espermático. (ESTEVENS, 2012).

A avaliação dos parâmetros seminais e classificação quanto à normalidade dos mesmos é tema de discussão frequente. Em 1999, a OMS publicou parâmetros seminais considerados como normais baseada em estudo apenas de casais férteis. Em 2010, a mesma reavaliou e publicou novas diretrizes menos rigorosas, mas ainda baseada em homens que tiveram filhos naturalmente o que não significa necessariamente que homens com parâmetros abaixo desses sejam incapazes de engravidar suas companheiras (HAMILTON, 2015). Outra classificação que vem sendo estudada se baseia na contagem total de espermatozoides móveis (TMSC- *Total Motile Sperm Count*) sem levar em consideração a morfologia espermática. (AYALA, 1996).

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 ESTRATÉGIA PARA LOCALIZAR E SELECIONAR A INFORMAÇÃO

A busca de referências bibliográficas envolveu as seguintes palavras-chave:

1) *Male Fertility*; 2) *Semen Analysis*; 3) *Seminal Parameters*; 4) *Sperm Function* nas bases de dados do PubMed, Scielo e Lilacs conforme descrito na Tabela 1.

Tabela 1. Resultado de busca de referências bibliográficas.

<b>Palavras-chave</b>	<b>PubMed</b>	<b>Scielo</b>	<b>Lilacs</b>
<i>Male Fertility</i>	1002	114	1193
<i>Semen Analysis</i>	894	111	2427
<i>Seminal Parameters</i>	57	65	114
<i>Sperm Function</i>	293	27	424

Foram incluídos na revisão da literatura para este trabalho, apenas artigos publicados na língua inglesa disponíveis no PubMed e portal CAPES nos últimos 10 anos com resultados relevantes para este estudo. Também se realizou busca nas referências dos artigos selecionados, em que os dados encontrados eram relevantes para este estudo mesmo que de período anterior.

## 2.2 AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS SEMINAIS

Apesar dos diversos testes de função espermática propostos para a avaliação da fertilidade masculina (TALWAR, 2015), o espermograma é principal para o diagnóstico e para avaliar a necessidade e qual o tipo de terapia indicada (ZHANG, 2014). São avaliadas principalmente os parâmetros seminais de contagem espermática total, motilidade, motilidade progressiva vitalidade, concentração, morfologia, volume e número de leucócitos. Entretanto, a concentração, motilidade e morfologia são os principais critérios para avaliação da qualidade espermática e se correlacionam com desfechos em tratamentos em reprodução assistida (ZHANG, 2014; MERVIEL, 2010; BADAWY, 2009).

Embora o espermograma seja a melhor forma de se avaliar a fertilidade, existe dificuldade principalmente nos casos de subfertilidade em função de existir uma grande variação entre os parâmetros seminais de diferentes ejaculados de um mesmo paciente. Por esse motivo, sugere-se a possibilidade de se indicar coleta para confirmação diagnóstica em casos de a primeira amostra estar alterada (LEUSHUIS, 2014). A OMS recomenda que duas amostras sejam avaliadas e que em casos discordantes, uma terceira análise seja realizada (WHO, 1999; WHO, 2010). Entretanto, estudo prospectivo que avaliou 897 casais com subfertilidade conforme os critérios da OMS de 1999, não encontrou diferença em se prever a chance de concepção quando se avaliava a primeira ou a segunda amostra seminal coletada, concluindo que duas amostras não oferecem dados adicionais do que uma única amostra (LEUSHUIS, 2014).

Diversos fatores exercem influência sobre os parâmetros seminais. Um deles é o tempo de abstinência sexual. Sugere-se que períodos prolongados de abstinência



aumentam volume seminal e concentração espermática, mas reduzem motilidade e vitalidade (MAYORGA-TORRES, 2015; MAGNUS, 1991). A Organização Mundial da Saúde (OMS) recomenda um período de abstinência de 2 a 7 dias antes da coleta seminal (WHO, 2010) e a ESHRE preconiza intervalos entre 3 a 4 dias (MAYORGA-TORRES, 2015; KVIST, 2002).

Outras situações como a obesidade, tabagismo e estresse oxidativo são frequentemente relacionados com piora nos parâmetros seminais (MAYORGA-TORRES, 2015; HAMMOUD, 2008). Também foram relatadas diferenças em parâmetros seminais de homens férteis conforme a etnia com menor volume, concentração total e porcentagem de espermatozoides móveis em homens negros quando comparados com caucasianos em estudo que avaliou amostras seminais de 763 homens (BRUCE, 2013).

Estudos tem avaliado, também, diferentes formas de se realizar a análise seminal com o surgimento da análise computadorizada com o intuito de tentar reduzir as diferenças entre os laboratórios e as falhas humanas no diagnóstico de infertilidade masculina (SANCHEZ, 2013). Entretanto, sugerem que a análise computadorizada não deve ser usada de rotina nas clínicas de reprodução humana em função de não avaliar adequadamente a função e a morfologia espermática (MORTIMER, 2015; WHO 1992).

### 2.2.1 Classificações Seminais

Em 1980 a OMS tentou esclarecer os questionamentos acerca da análise seminal publicando a primeira de 5 edições sobre recomendações sobre a

normalidade dos parâmetros. O ponto desfavorável dessa classificação é que ela nunca foi validada por estudos prospectivos (CATANZARITI, 2013).

Conforme diretrizes de 1980, classificava-se como normais amostras com: concentração entre 20 e 200 milhões de espermatozoides por mL, motilidade maior ou igual a 80,5%, motilidade progressiva maior ou igual a 2% e morfologia normal maior ou igual a 80,5%. Não estabelecia, entretanto, valores de referência para contagem total de espermatozoides, vitalidade e volume. Em 1987, surgiram novos valores considerados normais: volume maior ou igual a 2 mL, concentração de espermatozoides por mL acima de 20 milhões, contagem total de espermatozoides maior ou igual a 40 milhões, motilidade total maior ou igual a 50%, motilidade progressiva maior ou igual a 25%, vitalidade maior ou igual a 50%, morfologia normal maior ou igual a 50% e menos de 1 milhão de leucócitos por mL. Em 1992, alterou os valores de vitalidade para maior ou igual a 75% e de morfologia considerando normal uma porcentagem maior ou igual a 30% e passou a considerar a motilidade normal como maior ou igual a 25% de espermatozoides com motilidade rápida e progressiva (tipo a) (ESTEVENSON, 2012).

Em 1999, a OMS publicou novas diretrizes e considerou como avaliação seminal normal os seguintes parâmetros: volume maior ou igual a 2ml, concentração espermática de 20 milhões de espermatozoides por ml, 50% de espermatozoides com motilidade progressiva total e 25% de motilidade progressiva a (progressivos rápidos) e 14 % de espermatozoides com morfologia normal (WHO, 1999).

EM 2010, entretanto, a OMS revisou seus critérios sobre normalidade dos parâmetros seminais novamente e publicou novos pontos de corte. Os seguintes parâmetros passaram a ser considerados normais: volume maior ou igual a 1,5ml, concentração maior ou igual a  $15 \times 10^6$  espermatozoides por ml, motilidade a+b maior

ou igual 32% e morfologia normal (conforme critérios de Krüger) maior ou igual a 4%. E passou a classificar os espermatozoides quanto a motilidade entre móveis progressivos, móveis não progressivos e imóveis (WHO, 2010). A tabela 2 mostra as diferenças de cada manual da OMS.

Tabela 2. Classificações Seminais segundo a OMS.

Características Seminais	OMS 1980	OMS 1987	OMS 1992	OMS 1999	OMS 2010*
Volume (mL)	ND	≥ 2	≥ 2	≥ 2	1,5
Concentração (x 10 <sup>6</sup> /mL)	20-200	≥ 20	≥ 20	≥ 20	15
Motilidade Progressiva	≥ 2 <sup>3</sup>	≥ 25%	≥25% (a)	≥ 25%(a) ≥50%(a+B)	32%(a+b)
Vitalidade (% vivos)	ND	≥ 50	≥ 75	≥ 75	58
Morfologia (% normais)	80,5	≥ 50	≥ 30	≥ 14	≥ 4

ND= Não Definido

\*Menor limite de normalidade considerando o percentil 5

Tabela adaptada de Estevens, 2012.

Outra forma que recentemente vem sendo utilizada para avaliar a qualidade seminal se baseia na contagem total de espermatozoides móveis (TMSC). Essa classificação leva em consideração o volume ejaculado, a concentração espermática e a porcentagem de espermatozoides moveis sem incluir a morfologia espermática (HAMILTON, 2015).

### *2.2.1.1 OMS 1999*

Os valores considerados normais pela OMS em 1999 citados anteriormente, basearam-se em dados advindos de diversos laboratórios que utilizavam metodologias variadas e analisavam populações variadas sem padronização ou definição de população fértil. Isso permitia erros na classificação de normalidade, podendo classificar homens normais como inférteis caso os valores propostos de normalidade fossem muito altos sem refletir necessariamente a realidade ou caso os valores fossem muito inferiores aos necessários para a gestação por não haver dados sobre o tempo decorrido até as parceiras engravidarem (COOPER, 2010; VIEIRA, 2013; WHO, 1999).

### *2.2.1.2 OMS 2010*

Em função de questionamentos acerca da população usada como referência no manual de 1999, a OMS revisou e modificou seus critérios em 2010 (COOPER, 2010). Os novos pontos de corte anteriormente citados foram definidos a partir de estudo de 1953 homens de diversos países em que suas esposas tiveram a gestação há menos de 1 ano. Valores abaixo do percentil 5 desse grupo foram considerados como anormais. Além disso, a classificação deixou de separar os espermatozoides conforme seu tipo de motilidade em a, b, c ou d e passou a classificá-los entre móveis progressivos, móveis não progressivos e imóveis (WHO, 2010). Os limites de referência utilizados pela OMS se basearam em uma grande população de homens que recentemente foram pais. Homens com resultados abaixo desses limites não são necessariamente inférteis (HAMILTON, 2015).

Estudo avaliou amostras seminais conforme a classificação 2010 da OMS de pacientes encaminhados para centro de fertilidade masculina. Concluiu que os pacientes com parâmetros acima dos critérios da normalidade estavam sub-representados, mas encontrou que concentração espermática e motilidade foram inferiores nos homens com pelo menos um outro parâmetro seminal abaixo os critérios de 2010, sugerindo que pacientes com essas alterações geralmente apresentam disfunção global na espermatogênese (BAKER, 2015).

Catanzariti e colaboradores estudaram 529 amostras seminais consecutivas de 427 homens coletadas no mesmo departamento em Ancona, na Itália. As amostras eram tanto de pacientes saudáveis como de pacientes inférteis, com infecções, com varicocele ou outras patologias. Todas as amostras foram classificadas conforme os parâmetros da OMS de 1999 e de 2010. Como resultado os autores encontraram que 199 (37,83%) pacientes foram considerados normais conforme as duas classificações, 246 (46,77%) foram considerados anormais conforme as duas classificações e 82 (15,59%) foram considerados anormais conforme a classificação de 1999 e normais quando avaliados pelos parâmetros de 2010. Eles concluíram que nenhum paciente que era considerado previamente como normal passou a ser considerado anormal de acordo com a nova classificação, mas que aproximadamente 15% anteriormente considerados anormais passaram a ter parâmetros seminais dentro da normalidade conforme a classificação de 2010 (CATANZARITI, 2013).

### 2.2.1.3 *TMSC*

A classificação *TMSC* é obtida a partir da multiplicação do volume ejaculado em mililitros pela concentração espermática e pela proporção de espermatozoides

com motilidade a e b dividido por 100% sem levar em consideração a morfologia espermática. A mesma é realizada pré-processamento seminal (AYALA, 1996).

Poucos estudos avaliaram o valor preditivo dos critérios seminais da OMS em casais inférteis para estabelecer a relevância no prognóstico ou na escolha do tratamento ideal. Hamilton e colaboradores avaliaram 1177 pacientes com infertilidade masculina ou infertilidade sem causa aparente (normospermia) e classificaram as amostras seminais de acordo com as diretrizes de 2010 da OMS e de acordo com TMSC. TMSC maior do que  $20 \times 10^6$  foi considerado normal. Eles compararam as taxas de gestação espontânea, por IIU, por FIV e por ICSI entre os dois grupos e concluíram que um TMSC normal se correlaciona melhor com taxa de gestação do que uma amostra considerada normal pela OMS e anormal pelo TMSC (HAMILTON, 2015).

Xiao e colaboradores avaliaram 147 homens com 2 amostras seminais prévias à IIU anormais conforme os critérios da OMS de 2010 e 356 ciclos de IIU com estimulação ovariana controlada e comparou com 120 homens que tiveram um valor anormal pela classificação TMSC apenas no dia da IIU de 265 ciclos. Os dois grupos não apresentaram diferenças significativas na idade das pacientes femininas, em tempo de infertilidade, em número de gestações prévias, no valor de FSH basal e no número de folículos maduros no dia da maturação folicular. O estudo encontrou uma taxa de gestação superior no segundo grupo (5% versus 17% com  $p < 0,001$ ). Os autores concluíram que um valor anormal de TMSC no dia da inseminação não tem uma performance tão ruim quanto amostras seminais alteradas de pacientes com diagnóstico prévio de infertilidade masculina (XIAO, 2015).

Outro estudo retrospectivo que analisou 1.038 IIU de 353 casais encontrou que a melhor chance de gestação clínica se dava nos casais com as seguintes

características: mulheres com menos de 30 anos com fator de infertilidade cervical ou anovulatório e homens com TMSC maior ou igual a 5 milhões, esse último com um OR de 1.55 e  $p < 0,05$  (MERVIEL, 2008).

Estudo recente que avaliou 981 casais e 2.231 ciclos de IIU, comparou as análises seminais e sua influência nas taxas de gestação por IIU. O estudo encontrou como resultado que o TMSC melhor se correlacionou com taxa de gestação por IIU, mas as taxas de gestação não se alteraram quando foram comparados apenas os parâmetros anormais conforme as classificações da OMS de 1999 e de 2010 (PAPILLON-SMITH, 2015).

A classificação TMSC já foi utilizada para se avaliar a relação custo-efetividade dos tratamentos por nascidos vivos de casais inférteis em que a causa era subfertilidade masculina, considerada pelo estudo TMSC entre 3 milhões e 10 milhões. Tiveram como resultado que o custo-efetividade por nascidos vivos foi melhor na IIU quando comparada com FIV nos casais com TMSC maior do que 3 milhões e melhor com FIV quando TMSC abaixo de 3 milhões (MOOLENAR, 2015).

### 2.2.2 Estresse Oxidativo

O estresse oxidativo é causado por uma alteração na regulação entre a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e o sistema antioxidante, responsável por neutralizar e remover os radicais livres. O excesso de ROS gera uma resposta patológica que causa dano celular. O espermatozoide é particularmente suscetível a esse dano em função de sua membrana rica em ácidos graxos insaturados que oxidam facilmente e devido ao citoplasma ser pobre em enzimas antioxidantes. A oxidação lipídica leva a perda da integridade da membrana com

aumento na permeabilidade, inativação de enzimas celulares, dano ao DNA e apoptose celular. A consequência desses danos é uma redução na contagem e na motilidade e alterações na morfologia espermática (WALCZAK–JEDRZEJOWSKA, 2012). Estima-se que aproximadamente 25% dos homens inférteis apresentam níveis seminais elevados de ROS (AITKEN, 2010).

O principal sistema de enzimas antioxidantes no semen é a tríade de enzimas superóxido dismutase que envolve as enzimas catalase , glutathione peroxidase e superóxido dismutase. Essas são metaloenzimas que catalisam reações do ânion superóxido presentes em ambas as formas intra- e extracelulares. A glutathione peroxidase catalisa a redução do peróxido de hidrogênio e de peróxidos orgânicos como os peróxidos de fosfolípidos. Além desses, em seu sítio ativo, existe selênio na forma de selenocisteína que está localizada principalmente na matriz mitocondrial dos espermatozoides, mas é encontrada também na forma nuclear para proteger o DNA dos danos oxidativos. A glutathione peroxidase também já foi encontrada no plasma seminal, sugerindo a sua origem a partir da próstata (WALCZAK–JEDRZEJOWSKA, 2012).

Além das enzimas de neutralização do excesso de produção de ROS, um papel importante no sistema antioxidante de proteção é desempenhado por antioxidantes não enzimáticos que incluem, entre outros, glutathione, ácido pantotênico, coenzima Q10, carnitina, vitaminas A , E, C e complexo B e minerais como zinco e selênio (WALCZAK–JEDRZEJOWSKA, 2012).

Agarwal e colaboradores avaliaram 318 amostras seminais de homens inférteis e 56 de doadores de sêmen. Foi realizada avaliação dos parâmetros seminais e dos níveis seminais de ROS. Os doadores com fertilidade comprovada atualmente e os doadores com fertilidade comprovada nos últimos dois anos apresentaram, como



esperado, parâmetros seminais significativamente melhores do que todos os pacientes inférteis. Além disso, o estudo encontrou níveis significativamente menores de ROS nas amostras seminais dos dois grupos de pacientes doadores quando comparado com amostras de pacientes sabidamente inférteis. O estudo concluiu, também, que ROS se correlacionam negativamente com a concentração espermática, motilidade e morfologia (AGARWAL, 2014).

### 2.2.3 Estilo de Vida

A infertilidade masculina é um processo multifatorial. Considerando que a maioria dos casos se relacionam com deficiência na produção espermática de origem desconhecida, deve-se investigar fatores ambientais e nutricionais que possam agravar a situação incluindo exposição ao calor, agentes químicos, pesticidas ou metais pesados bem como hábitos dietéticos (NAZNI, 2014).

Atividade física regular pode ser benéfica. Entretanto, exercícios rigorosos e ciclismo por mais de 5h semanais foram relacionados com piora nos parâmetros seminais possivelmente relacionados ao calor ou trauma (SHARMA, 2013; WISE, 2011).

Outro hábito frequentemente relacionado com piora dos parâmetros seminais é o etilismo também relacionado com atrofia testicular e diminuição da libido (SHARMA, 2013). Um estudo que avaliou 100 homens etilistas encontrou apenas 12 amostras seminais de etilistas com contagem espermática normal e alteração em morfologia foi significativamente maior no grupo de etilistas do que no controle (GAUR, 2010).

### 2.2.3.1 Tabagismo

Os efeitos do tabagismo sobre a função reprodutiva masculina são amplamente estudados e relacionados com alterações nos parâmetros seminais (GANDINI, 1997). O cigarro contém aproximadamente 4000 componentes prejudiciais como monóxido de carbono, óxido de nitrogênio, amônia, hidrocarbonetos voláteis, alcaloides, nitrosaminas, nicotina e hidroxicotinina. E muitas dessas substâncias geram ROS e espécies reativas de nitrogênio que levam ao dano celular (TRABER, 2000).

Estudo, *in vitro*, que avaliou 10 amostras seminais de pacientes não-tabagistas submetidas a Nicotina e Cotinina concluiu que os efeitos deletérios do tabagismo no espermograma não se devem a essas substâncias. E que os danos mais provavelmente são causados pelos componentes da fase gasosa do fumo como aldeídos e hidrocarbonetos que induzem alteração na motilidade espermática (GANDINI, 1997).

Estudo publicado em 2014, que avaliou amostras seminais de 95 homens e comparou os parâmetros conforme classificação da OMS de 2010 e níveis seminais de óxido nítrico entre pacientes férteis tabagistas, inférteis não tabagistas e inférteis tabagistas encontrou uma média de óxido nítrico no plasma seminal significativamente menor nos pacientes férteis não tabagistas, seguido dos inférteis não tabagistas e maior nos inférteis tabagistas ( $p=0,018$ ). Os autores concluíram que o óxido nítrico pode exceder a capacidade antioxidante dos pacientes que fumam levando a um maior dano oxidativo no plasma seminal destes e, conseqüentemente, diminuindo sua fertilidade (YOUSEFNIAPASHA, 2015).

Outro estudo comparou 123 pacientes entre tabagistas e não tabagistas e encontrou relação entre o tabagismo e piora nos parâmetros de contagem e motilidade

espermática- sendo a última mais significativa. Embora os efeitos do tabagismo tenham sido descritos em todos os parâmetros seminais, seus efeitos específicos em cada parâmetro ainda precisam ser estabelecidos (LINGAPPA, 2015).

O cigarro, sabidamente, gera aumento nas concentrações de ROS e de cádmio que afetam a qualidade espermática. Entretanto, em casos de uma boa função testicular prévia, as lesões causadas pelos radicais livres podem ser compensadas não apontando alteração no espermograma nesses (SOARES, 2009).

### *2.2.3.2 Obesidade*

A obesidade, definida pela OMS como Índice de Massa Corporal (IMC) acima de  $30\text{kg/m}^2$ , é uma condição médica que sabidamente afeta negativamente a saúde com aumento em morbidade e mortalidade por diversos mecanismos (WHO, 2000). Os efeitos do IMC sobre os parâmetros seminais vêm sendo amplamente estudados. Diversos estudos encontraram associação negativa entre a obesidade e parâmetros seminais com redução na concentração espermática, na motilidade, na vitalidade, na morfologia e na integridade do DNA espermático (DU PLESSIS, 2010).

Diversas alterações hormonais decorrentes da obesidade parecem ser responsáveis por piora nos parâmetros seminais bem como na função erétil. Sugere-se que o aumento nos estrógenos em homens obesos decorrente da aromatização no tecido adiposo é um importante mecanismo que leva a hipoandrogenemia e por consequência, piora nos parâmetros seminais. A perda de peso pode corrigir esse desequilíbrio hormonal melhorando os parâmetros seminais (HAMMOUD, 2008).

Sugere-se, também, que a hiperinsulinemia, decorrente da obesidade, possa alterar a fertilidade masculina. Estudo de caso-controle com 42 pacientes realizado na

África do Sul, comparou as concentrações séricas e seminais de insulina, glicose e leptina de pacientes obesos com os valores de pacientes não-obesos. A obesidade foi associada com o aumento sérico e seminal de insulina e leptina, mas não houve diferença significativa na glicose seminal. Além disso, houve associação entre obesidade e redução na concentração e na vitalidade espermática e com aumento na fragmentação do DNA espermático. O estudo não encontrou impacto na morfologia ou na motilidade espermática (LEISEGANG, 2014).

#### 2.2.4 Comorbidades

Alterações nos parâmetros seminais têm sido relacionadas com diversas comorbidades. Entre elas, a obesidade, síndrome metabólica, dislipidemia e diabetes como descrito anteriormente (HAMMOUD, 2008). Além dessas, doenças cardiovasculares e hipertensão também são descritas em associação com infertilidade masculina. A fisiopatologia exata ainda permanece incerta e difícil de avaliar uma vez que essas doenças são menos frequentes em pacientes jovens em idade reprodutiva (EISENBERG, 2015).

Existe uma relação clara entre câncer de testículo e infertilidade. Além disso, tratamentos anti-neoplásicos também podem ser causa de infertilidade. Os significativos avanços nos tratamentos para câncer aumentam a expectativa e a qualidade de vida e a possibilidade de desejo de reprodução nos sobreviventes. Infertilidade e azoospermia são mais frequentes do que o hipogonadismo em função de as células germinativas serem mais sensíveis à quimioterapia e à radioterapia do que as células de Leydig (VASSILAKOULOPOULOU, 2015). Quimioterápicos podem afetar diretamente a espermatogênese. O acometimento testicular é dose e droga-

específico. Regimes quimioterápicos que incluem agentes alquilantes são particularmente relacionados com azoospermia permanente e com infertilidade. A cisplatina, frequentemente utilizada em tratamentos para câncer de testículo, pode afetar as células germinativas por um efeito tóxico direto e pela alteração na secreção de gonadotrofinas (PETERSEN, 2002; GERL, 2001). Além da quimioterapia, a radioterapia também pode causar hipogonadismo e infertilidade pelo efeito direto da radiação e pela possível redução na microcirculação testicular (QUARMBY, 1999).

A varicocele é uma alteração escrotal em que há aumento dos vasos em direção à veia testicular, mais comum à esquerda devido à anatomia com comunicação direta com a veia renal deste lado. A incidência gira em torno de 20-24% em adultos e é mais comum em homens inférteis afetando 25 a 40% desses. E existem dados que mostram uma melhor taxa de gestação e melhora significativa em parâmetros seminais 1 ano após a cirurgia para correção da varicocele (GRASSO, 2014).

Outra condição frequentemente relacionada à infertilidade masculina é a criptorquidia com a migração inadequada dos testículos para a bolsa testicular. Aproximadamente 10% dos homens inférteis têm história dessa patologia e o risco de infertilidade é 6 vezes maior em pacientes com criptorquidia bilateral em comparação com unilateral ou sem criptorquidia (ABACI, 2013; CHUNG, 2014).

Hipotireoidismo e hipertireoidismo são as desordens da tireóide que mais frequentemente afetam o sistema reprodutivo masculino. Hipotireoidismo por curtos períodos de tempo aparentemente não afeta a fertilidade enquanto o hipotireoidismo severo por períodos prolongados podem impactar na função reprodutiva embora a fisiopatologia no caso masculino não esteja bem estabelecida como na infertilidade feminina. Um estudo que comparou parâmetros seminais de 24 homens

hipotireoideos com os de 66 homens eutireoideos sem diferença significativa em idade, LH, FSH e testosterona livre entre os grupos, encontrou piora significativa em contagem espermática, motilidade e morfologia no grupo de casos (NIKOOBAKHT, 2012).

### 2.2.5 Inseminação Intrauterina e Parâmetros Seminais

A IIU é método de reprodução assistida indicada em casos de infertilidade de causa cervical, fator masculino relativo, anovulação, endometriose sem obstrução tubária e infertilidade sem causa aparente (MERVIEL, 2010). Além disso, é um procedimento frequentemente utilizado como primeira linha de tratamento em função de apresentar um custo relativamente baixo e por ser tecnicamente simples, podendo ser realizado em consultório médico e sem necessidade de equipamentos sofisticados (DICKEY, 1999).

Muitos são os fatores que influenciam nas taxas de gestação por IIU. Entre eles a idade da mulher, tempo e causa de infertilidade, contagem espermática, número de folículos maduros, concentração de estrogênio no dia da administração do HCG para maturação folicular e tipo de cateter utilizado. Entretanto, não é bem estabelecida a ordem de importância de cada um desses fatores (MERVIEL, 2010).

Estudo que avaliou 445 pacientes submetidas a um total de 820 ciclos de IIU com uma taxa de gestação por ciclo de 9,9% encontrou diferenças significativas na taxa de gestação conforme o valor de TMSC: 15% quando TMSC entre  $5 \times 10^6$  e  $10 \times 10^6$ ; 5,6% quando menor do que  $1 \times 10^6$ ; 5,1% quando entre  $1 \times 10^6$  e  $5 \times 10^6$  e 10,8% quando o TMSC era maior de  $10 \times 10^6$ . Além disso, encontrou associação entre a morfologia espermática e fator prognóstico na IIU, com uma taxa significativamente

maior de gestação quando as amostras apresentavam mais de 10% de espermatozoides morfolologicamente normais (12,6%), seguida das amostras que apresentavam entre 5 e 10% normais (10,1%) e com menor taxa de gestação clínica significativamente menor quando menos de 5% dos espermatozoides eram morfolologicamente normais (2,1%) (NIKBAKHT, 2011).

Um estudo retrospectivo realizado na França que analisou 4 anos de realização de IIU com um total de 1038 ciclos em 353 casais encontrou uma taxa de gestação por ciclo de IIU de 16,4%. Os grupos de gestantes e não gestantes não tiveram diferenças significativas em idade ou causa de infertilidade. Os autores encontraram uma chance 1,55 vezes maior de gestação com uma contagem total de espermatozoides móveis acima de 5 milhões e quando foi analisado combinadamente oligospermia (menos de 20 milhões de espermatozoide/ml) e astenospermia (motilidade inferior a 25%), a taxa de gestação clínica por casal reduziu de 37,6% para 13,4% ( $p < 0,05$ ) (MERVIEL, 2010).

Outro estudo que avaliou a influência das características seminais nos desfechos da IIU analisou 431 casais e 1.007 ciclos de tratamento por IIU entre 1999 e 2002. Os parâmetros seminais foram avaliados conforme as recomendações de 1999 da OMS e o único parâmetro pré-processamento seminal que se correlacionou com gravidez foi a motilidade espermática. Casais com amostras com motilidade acima de 80% apresentaram uma boa taxa de gestação (17,6% com  $p < 0,02$ ) (ZHAO, 2004).

Borges e colaboradores realizaram um estudo que também avaliou a importância dos parâmetros seminais na IIU, analisando 239 procedimentos de 155 casais. As indicações para o procedimento foram: fator masculino (38,6%), infertilidade sem causa aparente (32,9%), sêmen de doador (18,6%), fator ovariano

(7,1%), fatores femininos e masculinos combinados (1,4%) e ovários policísticos (1,4%). A taxa de gestação clínica por ciclo foi de 16,9% e por paciente foi de 24,5%. Não houve diferença significativa entre a idade das mulheres e o número de folículos detectados em ecografia transvaginal após estimulação ovariana controlada. Quando se analisou a concentração espermática do sêmen fresco, motilidade total e progressiva não houve diferença significativa entre os grupos de grávidas e não-grávidas. Quando foi realizada análise em relação à morfologia espermática, a média de formas normais encontradas nas amostras do grupo que engravidou foi significativamente maior do que no não engravidou (10,6 versus 6,4%, respectivamente, com  $p=0,028$ ). O estudo encontrou também uma taxa de gestação significativamente maior quando o número de espermatozoides inseminados foi maior que 15 milhões/mL (BORGES, 2003).

### **3 MARCO TEÓRICO**

Aproximadamente 15% dos casais apresentam o diagnóstico de infertilidade, sendo que 50% dos casos se devem a fatores masculinos (JAROW, 2002). Diversos testes de função espermática são propostos para a avaliação da fertilidade masculina, mas o espermograma é o principal exame para o diagnóstico (TALWAR, 2015; ZHANG, 2014).

Os critérios de normalidade OMS em relação a análise do espermocitograma de 1999 apresentava valores rígidos, classificando homens como inférteis sem necessariamente significar que os mesmos fossem incapazes de conceber naturalmente, sendo, por isso, revisada em 2010. Catanzariti e colaboradores, avaliaram 529 amostras seminais tanto de pacientes férteis e inférteis conforme a



classificação de 1999 e de 2010 da OMS. Concluíram que nenhum paciente que era considerado previamente normal passou a ser considerado anormal de acordo com a nova classificação, entretanto aproximadamente 15% considerados anormais em 1999 passaram a ter parâmetros seminais dentro da normalidade conforme a classificação de 2010 (CATANZARITI, 2013).

Outra classificação que vem sendo estudada é conhecida como TMS e é obtida a partir da multiplicação do volume ejaculado em mililitros pela concentração espermática e pela proporção de espermatozoides com motilidade a e b dividido por 100% sem levar em consideração a morfologia espermática. A mesma é realizada pré-processamento seminal e vem sendo estudada como alternativa na indicação de IU para subfertilidade masculina (MOOLENAR, 2015; AYALA, 1996).

#### **4 JUSTIFICATIVA**

A justificativa para a realização do presente estudo baseou-se no fato de haverem frequentes discussões acerca da classificação dos parâmetros seminais e dos fatores que podem influenciar nesses parâmetros e na fertilidade masculina conforme revisão da literatura. Além disso, terapias em reprodução assistida de baixa ou alta-complexidade são indicadas para casais inférteis levando-se em consideração, também, esses parâmetros.

Por esses motivos, determinar qual a classificação seminal que se correlaciona melhor com o grau de infertilidade masculina e definir quais os principais fatores que alteram os parâmetros seminais é de importância na investigação e orientação de casais com fator de infertilidade masculina bem como na indicação do melhor tratamento de reprodução assistida para cada casal.

## **5 OBJETIVOS**

### **5.1 OBJETIVO PRIMÁRIO**

O objetivo principal deste estudo é comparar as diferentes classificações de parâmetros seminais (OMS 1999, OMS 2010 e TMSC) e avaliar as características de pacientes em terapia de reprodução humana assistida que se relacionam com esses parâmetros.

### **5.2 OBJETIVOS SECUNDÁRIOS**

Como objetivo secundário, idealiza-se avaliar a influência das diferentes classificações seminais no diagnóstico ou não de infertilidade masculina bem como indagar a possibilidade de influência das mesmas na escolha do tratamento adequado para cada casal infértil.

## 6 REFERÊNCIAS

ABACI A., ÇATLI G., ANIK A., BÖBER E. Classification and Management of Undescended Testes: Does Medication Have Value in its Treatment? **J Clin Res Pediatr Endocrinol** 2013;5(2):65-72

AGARWAL A., SHARMA R. K., SHARMA R., ASSIDI M., ABUZENADAH A. M., ALSHAHRANI S., DURAIRAJANAYAGAM D., SABANEKH E. Characterizing semen parameters and their association with reactive oxygen species in infertile men. **Reproductive Biology and Endocrinology** 2014, 12:33

AITKEN R. J., DE IULIIS G. N., FINNIE J. M., HEDGES A., MCLACHLAN R. I. Analysis of the relationships between oxidative stress, DNA damage and sperm vitality in a patient population: development of diagnostic criteria. **Hum Reprod.** 2010; 25: 2415–2426.

AYALA C., STEINBERGER E., SMITH D. P. The influence of semen analysis parameters on the fertility potential of infertile couples. **J Androl** 1996; 17: 718-725.

BADAWY A., ELNASHAR A., ELTOTONGY M. Effect of sperm morphology and number on success of intrauterine insemination. **Fertil. Steril** 2009; 91:777-781.

BAKER K., LI J., SABANEKH E. J. 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: 59-65.

BORGES E. J., ROSSI L. M., ROCHA C. C., CALABRESI F., BUSSATO W. C., LACONELLI A. J. Importância dos Parâmetros Seminais nos Resultados de Inseminação Intra-uterina. **RBGO** 2003. 25 (4): 243-248.

BRUCE J. R., THOMAS W., MA W., DROBNIS E. Z., SPARKS A., WANG C., BRAZIL C., OVERSTREET J. W., LIU F., SWAN S. H., AND THE STUDY FOR FUTURE FAMILIES RESEARCH GROUP. Semen Parameters in Fertile US Men: The Study for Future Families. **Andrology** 2013; 1(6): 1-21.

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. **Archivio Italiano di Urologia e Andrologia** 2013. 85 (3); 125-129.

CHUNG E. BROCK G. B. Cryptorchidism and its impact on male fertility: a state of art review of current literature. **Can Urol Assoc J** 2011;5:210-214.

COOPER T. G., NOONAN E., VON ECKARDSTEIN S., AUGER J., GORDON BAKER H. W., BEHRE H. M., HAUGEN T. B., KRUGER T., WANG C., MBIZVO M. T et al., World Health Organization reference values for human semen characteristics. **Human Reprod Update** 2010; 16:231-245.

DICKEY R. P., PYRZAK R., LU P. Y., TAYLOR S. N., RYE P. H. Comparison of the sperm quality necessary for successful intrauterine insemination with World Health Organization threshold values for normal sperm. **Fertil Steril** 1999; 71:684-689.

DU PLESSIS S. S., CABLER S., MCALISTER D. A., SABANEHGH E., AGARWAL A. The effect of obesity on sperm disorders and male infertility. **Nat Rev Urol** 2010, 7:153-161.

EISENBERG M. L., LI S., BEHR B., PERA R. R., CULLEN M. R. Relationship between semen production and medical comorbidity. **Fertility and Sterility** 2015; 103(1): 66-71

ESTEVENS C. S., ZINI A., AZIZ N., ALVAREZ J. G., SABANEHGH E. S., 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: 16-22, 2012.

GANDINI L., LOMBARDO F., LENZI A., CULASSO F., PACIFICI R., ZUCCARO P., DONDERO F. The in-vitro effects of nicotine and cotinine on sperm motility. **Human Reproduction** 1997; 727-733

GAUR D. S., TALEKAR M. S., PATHAK V. Alcohol intake and cigarette smoking: Impact of two major lifestyle factors on male fertility. **Indian J Pathol Microbiol** 2010;53:35-40

GERL A., MUHLBAYER D., HANSMANN G., et al. The impact of chemotherapy on Leydig cell function in long term survivors of germ cell tumors. **Cancer** 2001; 91:1297-1303.

GRASSO M., LANIA C., BLANCO S., CONFALONIERI S., GRASSO A. A. C. Efficacy of spermatic vein ligation in patients affected by high grade left varicocele. **IBJU** 2014. 40 (1): 62-66

HAMILTON J. A. M., CISEN M., BRANDES M., SMEENK J. M. J., DE BRUIN J. P., KREMER J. A. M., NELEN W. L. D. M., HAMILTON C. J. C. M. Total motile sperm count: a better indicator for the severity of male factor infertility than the WHO sperm classification system. **Human Reproduction** 2015; 30: 110-1121.

HAMMOUD A. O., GIBSON M., PETERSON C. M., MEIKLE W., CARRELL D.T. Impact of male obesity on infertility: a critical review of the current literature. **Fert Steril** 2008, 90:897-904.

JAROW J. P., SHARLIP I. D., BELKER A. M., LIPSHULTZ L. I., SIGMAN M., THOMAS A. J., SCHLEGEL P. N., HOWARDS S. S., NEHRA A., DAMEWOOD M. D., OVERSTREET J. W., SADOVSKI R. Best practice policies for male infertility. Male infertility best practice policy committee of the American Urological Association Inc. **J Urol** 2002, 167:2138-2144.

KVIST U., BJORDAHL L. Manual on basic semen analysis, 202. Published with ESHRE by **Oxford University Press**, 2002.

KUPKA M. S., ERB K., D'HOOGHE T., CASTILLA J. A., CALHAZ-JORGE C., DE GEYTER C., GOOSSENS V., THE EUROPEAN IVF-MONITORING (EIM) CONSORTIUM, FOR THE EUROPEAN SOCIETY OF HUMAN REPRODUCTION AND EMBRIOLOGY (ESHRE). Assisted reproductive technology in Europe, 2010: results generated from European registers by ESHRE. **Human Reproduction** 2014; 29: 2099-2113.

LEISEGANG K., BOUIC P. J. D., MENKVELD R., HENKEL R. R. Obesity is associated with increased seminal insulin and leptin alongside reduced fertility parameters in a controlled male cohort. **Reproductive Biology and Endocrinology** 2014, 12:34.

LEUSHUIS E., VAN DER STEG J. W., STEURES P., REPPING S., BOSSUYT P. M. M., MOL B. W. J., HOMPES P. G. A., VAN DER VEEN F. Semen analysis and prediction of natural conception. **Human Reproduction** 2014; 7:1360-1367.

LINGAPPA H. A., GOVINDASHETTY A. M., PUTTAVEERACHARY A. K., MANCHAI AH S., KRISHNAMURTHY A., BASHIR S., DODDAIAH H. Evaluation of Effect of Cigarette Smoking on Vital Seminal Parameters which Influence Fertility. **J Clin Diagn Res** 2015; 9(7)

MAGNUS O., TOLLESFRUD A., ABYHOLM T., PURVIS K. Effects of varying the abstinence period in the same individuals on sperm quality. **Arch Androl.** 1991; 26(3): 199-203.

MAYORGA-TORRES B. J. M., CAMARGO M., AGARWAL A., DU PLESSIS S. S., CADAVID A. P., MAYA W. D. C. Influence of ejaculation frequency on seminal parameters. **Reproductive Biology and Endocrinology** 2015; 13:47.

MERVIEL P., HERAUD M. H., GRENIER N., LOURDEL E., SANGUINET P., COPIN H. Predictive factors for pregnancy after intrauterine insemination (IUI): An analysis of 1038 cycles and a review of the literature. **Fertility and Sterility** 2010; 93:79-88.

MORTIMER S., VAN DER HORST G., MORTIMER D. The future of computer-aided sperm analysis. **Asian Journal of Andrology** 2015; 17: 545-553.

MOOLENAR L. M, CISEN M., BRUIN J. P., HOMPES P. G. A., REPPING S., VAN DER VEEN F., MOL B. W. J. Cost-effectiveness of assisted conception for male subfertility. **Reproductive BioMedicine Online** 2015; 30: 659-666.

NAZNI P. Association of western diet & lifestyle with decreased fertility. **Indian J Med Res.** 2014 Nov; 140(1):78–81.

NIKBAKHT R., SAHARKHIS N. The Influence of Sperm Morphology, Total Motile Sperm Count of Semen and the Number of Motile Sperm Inseminated in Sperm Samples on the Success of Intrauterine Insemination. **International Journal of Fertility and Sterility** 2011; 5(3):168-173

NIKOObAKHT M. R., ALOOSH M., NIKOObAKHT N., MEHRSAY A., BINIAZ F., KARJALIAN M. The Role of Hypothyroidism in Male Infertility and Erectile Dysfunction. **Urology Journal** 2012; 9(1):405-9

OMBELET W., VAN ROBAYS J. Artificial insemination history: hurdles and milestones. **Facts Views Vis Obyn** 2015; 7(2): 137-143.

PAPILLON-SMITH J., BAKER S. E., AGBO C., DAHAN M. H. Pregnancy rates with intrauterine insemination: comparing 1999 and 2010 World Health Organization semen analysis norms. **Reproductive BioMedicine Online** 2015; 30: 392-400.

PETERSEN P. M., GIWERCMAN A., DAUGAARD G., et al. Effect of graded testicular doses of radiotherapy in patients treated for carcinoma-in-situ in the testis. **J. Clin. Oncol.**2002; 20: 1537-1543.

QUARMBY S., KUMAR P., KUMAR S., Radiation-induced normal tissue injury: role of adhesion molecules in leukocyte-endothelial cell interactions. **Int. J. Cancer** 1999; 82:385-395.

SANCHEZ V., WISTUBA J., MALLIDIS C. Semen analysis: update on clinical value, current needs and future perspectives. **Reproduction** 2013; (146): 249-258.

SHARMA R., BIEDENHARN K. R., FEDOR J. M., AGARWAL A. Lifestyle factors and reproductive health: taking control of your fertility. **Reproductive Biology and Endocrinology** 2013, 11:66

SOAREs S. Cigarette Smoking and Fertility. **Reproductive Biology Insights.** 2009;(2):39–46.

TALWAR P., HAYATNAGARKAR S. Sperm function test. **J Hum Reprod Sci.** 2015, Apr-Jun; 8(2):61-69.

TRABER M. G., VAN DER VLIET A., REZNICK A. Z., CROSS C. E. Tobacco-related diseases. Is there a role for antioxidant micronutrient supplementation? **Clin Chest Med.** 2000; 21(1): 173-187.

VASSILAKOPOULOU M., BOOSTANDOOST E., PAPAXOINIS G., ROUGE T. L. M., KHAYAT D., PSYRRI A. Anticancer treatment and fertility: Effect of therapeutic modalities on reproductive system and functions. **Critical Reviews in Oncology/ Hematology** 2015; 1-7.

VIEIRA M. Novos valores de referência de normalidade para análise seminal da Organização Mundial da Saúde: como ficamos? **Einstein** 2013; 11(2)263-4

WALCZAK–JEDRZEJOWSKA R., WOLSKI J. K., SLOWIKOWSKA–HILCZER J. The role of oxidative stress and antioxidants in male fertility. **Central European Journal of Urology** 2012; 60-67

WISE L. A., CRAMER D. W., HORNSTEIN M. D., ASHBY R. K., MISSMER S. A. Physical activity and semen quality among men attending an infertility clinic. **Fertil Steril** 2011, 95:1025–1030.

World Health Organisation: Obesity: preventing and managing the global epidemic. Geneva: WHO Technical Report Series number 894; 2000

World Health Organization. WHO Laboratory Manual for the Examination and processing of human semen. 5th ed. Geneva: **WHO Press** 2010.

World Health Organization. WHO Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Sperm-Cervical Mucus Intercation , 4th ed. **Cambridge University Press** 1999; 128.

XIAO C. W., AGBO C., DAHAN M. H. Comparison of pregnancy rates in pre-treatment male infertility and low sperm count at insemination. **Arch Gynecol Obstet**. 2015.

YOUSEFNIAPASHA Y., JORSARAEI G., GHOLINEZHADCHARI M., MAHJOUR S., HAJIAHMADI M., FARSI M. Nitric Oxide Levels and Total Antioxidant Capacity in The Seminal Plasma of Infertile Smoking Men. **CELL JOURNAL(Yakhteh)**, 2015; 17(1): 129-136

ZHANG E., TAO X., XING W., CAI L., ZHANG B. Effect of Sperm Count on Success of Intrauterine Insemination in Couples Diagnosed with Male Factor Infertility. **Mater Sociomed** 2014; 26 (5):321-323.

## 7 ARTIGO

COMPARISON BETWEEN THE WHO 1999 AND WHO 2010 AND TOTAL MOTILE SPERM COUNT FOR SEMEN ANALYSIS.

Patrícia De Moraes De Zorzi<sup>1</sup>

Helena von Eye Corleta<sup>2</sup>

Ana Paula de Souza Kussler<sup>3</sup>

1. Master's candidate, Graduate Program in Medical Sciences, UFRGS, Faculty of Medicine
2. Professor, Department of Obstetrics and Gynecology and Graduate Program in Medical Sciences, UFRGS, Faculty of Medicine
3. Embriologist, PhD student in Gynecology and Obstetrics, UFRGS, Faculty of medicine.

Corresponding author:

Patrícia De Moraes De Zorzi

Rua Marechal Floriano, 555, sala 603, Centro, Caxias do Sul

Tel.: 5432257869

Email: [pdzcx@hotmail.com](mailto:pdzcx@hotmail.com)



## **ABSTRACT**

**Introduction:** Approximately 15% of couples presenting the diagnosis of infertility, and 50 % of cases are due to male factors. Several sperm function testing is proposed for the evaluation of male fertility, but sperm is the first test for the diagnosis of male infertility causes. The prognostic value of the seminal characteristics as concentration, morphology and motility as male infertility markers is often confused. Evaluation of semen parameters and classification for normality remains frequent topic of discussion.

**Methods:** Retrospective study based on chart review evaluated 477 semen samples from men undergoing investigation or infertility treatments in assisted reproduction between 2011 and 2015.

**Results:** 401 patients were considered abnormal by the WHO 1999, 223 by WHO 2010 and 200 for TMSC. The criteria that mosto changed the classification was sperm morphology.

**Conclusion:** The parameters have become less rigid 1999 to 2010 significantly changing the proportion of individuals who are no longer classified as infertile. The classification based on TMSC can't define an individual as fertile or infertile regardless due to not take into account the sperm morphology, but may be helpful when it comes to the indication of the intrauterine insemination.

**Keywords:** *Male Fertility; Semen Analysis; Seminal Parameters; Sperm Function*

## INTRODUCTION

Approximately 15% of couples presenting the diagnosis of infertility, with 50% of cases is due to male factors (JAROW, 2002). Several sperm function testing is proposed for the assessment of fertility, but the spermogram is the main test for the diagnosis of male infertility (TALWAR, 2015; ZHANG,2014).

According to a publication in 2014, there were a study carried out together with the European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE) which reviewed the treatments conducted in 2010 in the European countries. Approximately 176.512 intrauterine insemination cycles were reported by 23 European countries in 2010. Most cases occurred in France, Italy, and Spain. The average number of births per cycle was 8.9% in inseminations without donation. 38.124 cycles were reported by 20 countries where the majority was from Denmark, France, Spain and the UK. The birth rate per cycle in these cases was 13.8% (KUPKA, 2014).

Semen analysis is extremely important in the investigation of infertile couples and their results are often regarded as absolute in their ability to promote pregnancy. This analysis promotes the information about the status of the seminiferous tubules, epididymis and accessory sex glands. The prognostic value of the seminal characteristics as concentration, morphology and motility which are considered as male infertility markers is often confused. The male fertility potential is influenced by sexual activity, the function of the accessory glands and other conditions. The routine semen analysis alone has its limitations and does not take into consideration the sperm dysfunction as immature chromatin or damage in the spermatid DNA. (ESTEVENS, 2012).

The evaluation of semen parameters and classification, as well as the normality of them is a frequent topic of discussion. In 1980 the WHO tried to clarify the questions about the seminal analysis by publishing the first five editions of recommendations on the normal parameters. The negative point of this classification is that it has never been validated by prospective studies (CATANZARITI, 2013).

In 1999, the WHO published seminal parameters which considered as normal, based only on the study of fertile couples. The values considered normal by the WHO in 1999 were: volume greater than or equal to 2 ml, sperm concentration of  $20 \times 10^6$  sperm per ml, 25% of sperm motility with a (rapid progressives) and 14% spermatozoa with normal morphology (WHO 1999). This classification is based on data coming from different laboratories using different methodologies and analyzed various populations without a standard or definition of fertile population. This allowed errors in the classification of normality, and may classify normal men as infertile if the proposed values of normality were very high without necessarily reflect the reality, or if the values were much lower than those required for pregnancy because there is no data on the time until the partner becoming pregnant (COOPER, 2010; VIEIRA, 2013).

In 2010, WHO published less strict guidelines, but still based on men who have had children naturally which doesn't necessarily mean that men with parameters below these are infertile (HAMILTON, 2015). The new cut-off points were defined based on a study of 1953 men of various countries in which their wives had the pregnancy less than one year. Values below the 5th percentile of this group were considered abnormal. The normal values after 2010 WHO review were: volume greater than or equal to 1.5 ml, concentration  $15 \times 10^6$  spermatozoa per ml, motility a+b greater than or equal to 32%, and normal morphology (Krüger criteria) greater than or equal to 4%. Besides that, the classification is no longer to separate the sperm according to their type of

motility in a, b, c or d and began to classify them among progressive furniture, not progressive movable and immovable (WHO, 2010).

The reference limits used by the WHO is based on a large population of men who recently were parents. Therefore, men with results below those limits are not necessarily infertile (HAMILTON, 2015).

Another classification that has been studied is based on the total motile sperm count (TMSC). Is obtained by multiplying the ejaculate volume by sperm concentration in milliliters and the proportion of motile sperm  $a+b$  divided by 100% without taking into account the morphology and the performed seminal preprocessing. (AYALA, 1996)

Few studies have evaluated the predictive value of the WHO seminal criteria for infertile couples to establish the relevance prognosis or choice of treatment. Hamilton and colleagues evaluated 1177 patients with male infertility or unexplained infertility and classified the semen samples in accordance with the guidelines of the WHO in 2010 and according to TMSC. TMSC greater than  $20 \times 10^6$  is considered normal. They evaluated pregnancy rates comparing de two groups and found that normal TMSC relates better with pregnancy than normal WHO. The study concluded that TMSC is more useful to express the severity of the male factor infertility than WHO (HAMILTON, 2015).

## **METHODOLOGY**

This study is a longitudinal, retrospective study with retrospective chart review to evaluate the characteristics of 477 male patients in assisted reproduction therapy and their semen parameters and compare the semen parameters according to WHO classifications 1999, WHO 2010 and TMSC.

477 men who had some treatment or investigation of infertility between 2011 and 2015 in the private reproduction clinic in Porto Alegre, Generar- Human Reproduction were included.

The informed consent was replaced by the reviewers commitment term to maintain secrecy name or characteristics that can identify patients (Appendix 1) and by the document stating contact and permit the treating physician to review the files (Annex 2).

Statistical analyzes were performed using SPSS version 21.0 software and the significance level was 5% ( $p \leq 0.05$ ). Quantitative variables were expressed as mean and standard deviation or median and interquartile range. Categorical variables were described by absolute and relative frequencies. To compare means, T-student test was used. To compare the proportions, the qui-quadrado of Pearson test or Fisher's exact tests were used. To compare alterations in WHO criteria among the criteria for 1999 and 2010, the McNemar test was applied.

This study is ethically and methodologically according to the Guidelines and Norms Regulating Research Involving Human Beings and was submitted to the Ethics Committee of the Federal University of Rio Grande do Sul / Brazil Platform.

## **RESULTS**

The semen of 477 patients with a mean age of 37 was analyzed (Table 1). Approximately 21% were obese and 10% were smokers. 25% reported a comorbidity, and 1% reported having treated some neoplasia and 4.5% of patients have used a psychoactive drugs.

The data on semen samples are shown in Table 2. The average period of sexual abstinence before collection was  $3.65 \pm 1.77$  days.

When comparing the two classifications of WHO, there was a significant alteration in all parameters from 1999 to 2010, except for total concentration. Of the 477 samples analyzed, 293 (61.4%) have at least two alterations for the 1999 criteria and that number was reduced to 112 (23.5%) when they were classified by the WHO 2010 criteria.

Considering both the absolute and the relative differences to the three parameters that have been most altered in semen samples evaluated at 2010 criteria were respectively, morphology, vitality and motility a+b (Table 3). Figure 1 illustrates these differences, highlighting the morphology as the most altered condition of the patient 1999 to normal 2010 standard. Confirming this finding, it can be seen in Figure 2 that 85.1% of the samples did not show any alteration in morphology when they were classified by the parameters 2010 of WHO. When semen samples were analyzed according to three classifications studied, 401 (84.1%) had an alteration by the WHO 1999, 223 (46.8%) by WHO 2010 and 200 (41.9%) by TMSC.

When at least two of the clinically relevant seminal parameters (total concentration, concentration per ml, motility and morphology) were altered, the number of samples considered abnormal, decreased to 61.4% according to criteria of the WHO 1999 and to 23.5% as 2010.(Table 4).

The analysis of associations between normal samples ( $\geq 20$  million) and altered ( $<20$  million) by TMSC with WHO classifications in 1999 and 2010 are presented in Table 5. There was a significant association in all parameters. Of the 200 samples considered modified by TMCS, 192 (96%) had at least 2 alterations by WHO in 1999 as the WHO 2010 only 108 (54%). On the other hand, of the 277 samples considered

normal by TMSC, 101 (36.5%) had more than 2 alterations by WHO in 1999 and only 4 (1.4%) had more than 2 alterations by WHO 2010.

Regarding the alteration in the parameter motility, patients with motility alterations for 1999 and 2010, had a mean age significantly higher without association with TMSC. And by WHO 1999, men with motility disorders showed significantly more days of abstinence (Table 6) without association with TMSC classification or by WHO in 2010.

The analysis of samples with alterations in morphology, showed higher proportion of smokers and patients with comorbidities by 2010. There was no association when these samples were classified according to the criteria of 1999 or TMSC (Table 6).

When they were included in the analysis of parameters of volume, motility and concentration in accordance with the WHO classifications of 1999 and 2010 without taking into account the morphology and vitality, it was found that 25.4% of the patients were obese with alteration for 1999 versus 15.8% of patients with no alteration in these parameters. In addition, patients with 2 or more alterations by the 1999 classification had significantly higher BMI (Table 6). These associations were not found when evaluated TMSC classification.

Among patients with volume alteration, by 1999 there were a higher proportion of hypertension (9.5% vs. 3.6%,  $p = 0.023$ ) and shorter withdrawal time (Table 6). However, according to the WHO 2010 and TMSC, were not significantly associated with any of the variables.

The vitality analysis showed statistically significant increase in smokers and higher mean age among patients with vitality alterations by 2010 (Table 6). The same

semen samples classified by WHO criteria of 1999 and by TMSC no significant association.

## **DISCUSSION**

WHO normality criteria regarding 1999 seminal analysis had very strict values, classifying men as infertile without necessarily mean that they were unable to conceive naturally, and therefore revised in 2010. Catanzariti and colleagues evaluated 529 semen samples for both fertile and infertile patients, 199 (37.83%) patients were considered normal as the two classifications, 246 (46.77%) by both abnormal and 82 (15.59%) were considered abnormal according to the classification of 1999 and normal according to WHO classification of 2010. They concluded that any patient who was previously considered standard has been considered abnormal according to the new classification, though about 15% considered abnormal in 1999 began to have parameters seminal within the normal range according to the 2010 classification (CATANZARITI, 2013).

The present study is similar but more expressive data, probably due to all samples were from patients of an assisted reproduction clinic. It was found that approximately 84% of the samples had alterations in any parameter WHO 1999 while this value was reduced to 46.8% in 2010. When analyzing at least two clinically relevant parameters, 61,4% were altered by WHO classification 1999 and decreased to 23.5% of patients considered altered by the WHO in 2010, confirming the data of the WHO 1999 overestimates the amount of abnormal samples without necessarily mean infertility.



By the 2010 WHO classification, all semen parameters have become less stringent by increasing the number of men with tests within normal limits. The parameter that influenced the difference between the two classifications was morphology in which 85.1% of the samples considered altered by the WHO in 1999 began to be considered normal by 2010 followed by vitality (56.3%), motility a + b (51, 3%). Total concentration parameter altered by only 0.6%. Although the morphology was the parameter that most altered the WHO classification, some studies suggest that it is not the primary parameter to be predicted breeding outcome. Study that evaluated 856 IUI (Intra uterine insemination) found no significant difference in the pregnancy rate for IUI in patients with smaller or larger morphology than 4% (17.3% versus 16.7%) and concluded that altered in morphology should not be isolated parameter to indicate IVF (In Vitro Fertilization) (DEVENEAU, 2014).

Another study that evaluates the impact of morphology in the success of IUI found no significant difference in the rate of live births in couples with unexplained infertility, but found a higher live birth rate in couples with male subfertility when more than 4.5% of spermatozoa have normal morphology. (ERDEM, 2015).

Unlike previous, Nikbakht and Sharins have found significantly higher pregnancy rate when samples have more than 10% morphologically normal spermatozoa (12.6%), followed by samples showing normal between 5 and 10% (10.1%) and lower rate of clinical pregnancy when less than 5% of the sperm were morphologically normal (2.1%) (NIKBAKHT, 2011).

Few studies have evaluated the predictive value of seminal WHO criteria for infertile couples to establish the relevance prognosis or choice of optimal treatment. Recent studies have used TMSC rating for mainly evaluate the pregnancy rate in IUI regardless of sperm morphology. Hamilton and colleagues evaluated 1177 patients

with male infertility and unexplained infertility and classified the semen samples in accordance with the guidelines of the WHO in 2010 and according to TMSC. TMSC greater than  $20 \times 10^6$  is considered normal. They evaluated pregnancy rates comparing the two groups and found that normal TMSC relates better with pregnancy than normal WHO (HAMILTON, 2015).

In our sample, patients were compared according to the three classifications (WHO 1999, WHO 2010 and TMSC), 401 (84.1%) had an alteration by the WHO in 1999, 223 (46.8%) by the WHO in 2010 and 200 (41, 9%) by TMSC. In addition to this, the analysis of associations between TMSC with alteration in WHO in 1999 and 2010 rankings, found significant association in all parameters (concentration, motility, morphology, volume and vitality) between TMSC alteration with the other alterations in the WHO rankings.

Of the 200 samples considered modified by TMCS, 192 (96%) had at least 2 alterations by WHO in 1999 as the WHO 2010 only 108 (54%). On the other hand, of the 277 samples considered normal by TMSC, 101 (36.5%) had more than 2 alterations by WHO in 1999 and only 4 (1.4%) had more than 2 alterations by 2010. Furthermore, it was found that the 200 samples considered altered by TMSC, 192 (96%) had at least 2 alterations by WHO in 1999, and approximately half of the samples was also altered by 2010. Moreover, the normal 277 samples the TMSC, 101 (36.5%) had alterations in two or more parameters by WHO in 1999 and only four (1.4%) by WHO 2010. It can be concluded that samples with altered TMSC correlate with alterations and by WHO in 1999 patients with normal TMSC are likely to be considered normal by the WHO 2010. This data can be useful when evaluating IUI indicated that the morphology may not be decisive, since TMSC not consider the morphology on your criteria. In addition, further studies are needed comparing the

seminal ratings and correlating the same with natural conception rate and pregnancy rate for IUI.

This study is in agreement with previously published studies that environmental factors affect the sperm quality (NAZNI, 2014; GAUR, 2010; LINGAPPA, 2015; DU PLESSIS, 2010; HAMMOUD, 2008). Environmental factors, lifestyle and disease can worsen the seminal quality deterioration in vitality, morphology and volume and with increased age there worsens the parameters of motility and vitality. Added to this, another study reports the deterioration in semen quality over the last 10 years in patients undergoing infertility treatments with a significant reduction in concentration per (ml) total concentration and percentage of normal forms corroborating the data that lifestyle and environmental factors may alter male fertility (BORGES, 2015).

It concludes that the seminal ratings have often altered due to the methodological difficulty in establishing that fact that individuals are unable to generate a pregnancy naturally. In general, the parameters have become less rigid 1999-2010 significantly changing the proportion of individuals who are no longer classified as infertile from the new criteria. And classification based on TMSC may have some value when evaluating IUI indicated that the concentration and motility are the main fundamental keys without defining an individual as fertile or infertile regardless due to not take into account the sperm morphology. This study is limited to the fact of having evaluated a sample in a clinic of assisted reproduction and not individuals generally fertile and infertile. More studies are needed to understand and to offer treatments based on evidence for male subfertility, for now the old parameters of the partnership and infertility time play a fundamental role in the clinical indicate the assisted reproduction treatments.

## REFERENCES

- AYALA C., STEINBERGER E., SMITH D. P. The influence of semen analysis parameters on the fertility potential of infertile couples. **J Androl** 1996; 17: 718-725.
- BORGES E. J., SETTI A. S., BRAGA D. P. A. F., FIGUEIRA R. C. S., IACONELLI . Decline in semen quality among infertile men in Brazil during the past 10 years. **IBJU** 2015; 41 (4): 757-763.
- 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 consecutives samples. **Archivio Italiano di Urologia e Andrologia** 2013; 85 (3); 125-129.
- COOPER T. G., NOONAN E., VON ECKARDSTEIN S., AUGER J., GORDON BAKER H. W., BEHRE H. M., HAUGEN T. B., KRUGER T., WANG C., MBIZVO M. T et al., Word Health Organization reference values for human semen characteristics. **Human Reprod Update** 2010; 16:231-245.
- DEVENEAU N. E., SINNO O., KRAUSE M., EASTWOOD D., SANDLOW L., ROBB P., GRANLUND A., STRAWN E. Y. J. Impact of sperm morphology on the likelihood of pregnancy after intrauterine insemination. **Fertil Steril** 2014; 102 (6):1584-90.
- DU PLESSIS S. S., CABLER S., MCALISTER D. A., SABANEKH E., AGARWAL A. The effect of obesity on sperm disorders and male infertility. **Nat Rev Urol** 2010, 7:153–161.
- EISENBERG M. L., LI S., BEHR B., PERA R. R., CULLEN M. R. Relationship between semen production and medical comorbidity. **Fertility and Sterility** 2015; 103(1): 66-71
- ERDEM M., ERDEM A., MUTLU F. M., OZISIK S., YILDIZ S., GULER I., KARAKAYA C. The impact of sperm morphology on the outcome of intrauterine insemination cycles with gonadotropins in unexplained and male subfertility. **European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology** 2015; 197:120-124.
- ESTEVEENS C. S., ZINI A., AZIZ N., ALVAREZ J. G., SABANEKH E. S., 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: 16-22, 2012.
- GAUR D. S., TALEKAR M. S., PATHAK V. Alcohol intake and cigarette smoking: Impact of two major lifestyle factors on male fertility. **Indian J Pathol Microbiol** 2010;53:35-40
- HAMILTON J. A. M., CISEN M., BRANDES M., SMEENK J. M. J., DE BRUIN J. P., KREMER J. A. M., NELEN W. L. D. M., HAMILTON C. J. C. M. Total motile sperm count: a better indicator for the severity of male factor infertility than the WHO sperm classification system. **Human Reproduction** 2015; 30: 110-1121.

HAMMOUD A. O., GIBSON M., PETERSON C. M., MEIKLE W., CARRELL D.T. Impact of male obesity on infertility: a critical review of the current literature. **Fert Steril** 2008, 90:897–904.

JAROW J. P., SHARLIP I. D., BELKER A. M., LIPSHULTZ L. I., SIGMAN M., THOMAS A. J., SCHLEGEL P. N., HOWARDS S. S, NEHRA A., DAMEWOOD M. D., OVERSTREET J. W., SADOVSKI R. Best practice policies for male infertility. Male infertility best practice policy committee of the American Urological Association Inc. **J Urol** 2002, 167:2138-2144.

KUPKA M. S., ERB K., D'HOOGHE T., CASTILLA J. A., CALHAZ-JORGE C., DE GEYTER C., GOOSSENS V., THE EUROPEAN IVF-MONITORING (EIM) CONSORTIUM, FOR THE EUROPEAN SOCIETY OF HUMAN REPRODUCTION AND EMBRIOLOGY (ESHRE). Assisted reproductive technology in Europe, 2010: results generated from European registers by ESHRE. **Human Reproduction** 2014; 29: 2099-2113.

LINGAPPA H. A., GOVINDASHETTY A. M., PUTTAVEERACHARY A. K., MANCHAIH S., KRISHNAMURTHY A., BASHIR S., DODDAIAH H. Evaluation of Effect of Cigarette Smoking on Vital Seminal Parameters which Influence Fertility. **J Clin Diagn Res.** 2015; 9(7)

NAZNI P. Association of western diet & lifestyle with decreased fertility. **Indian J Med Res.** 2014 Nov; 140(1):78–81.

NIKBAKHT R., SAHARKHIS N. The Influence of Sperm Morphology, Total Motile Sperm Count of Semen and the Number of Motile Sperm Inseminated in Sperm Samples on the Success of Intrauterine Insemination. **International Journal of Fertility and Sterility** 2011; 5(3):168-173

PAPILLON-SMITH J., BAKER S. E., AGBO C., DAHAN M. H. Pregnancy rates with intrauterine insemination: comparing 1999 and 2010 World Health Organization semen analysis norms. **Reproductive BioMedicine Online** 2015; 30: 392-400.

TALWAR P., HAYATNAGARKAR S. Sperm function test. **J Hum Reprod Sci.** 2015; 8(2):61-69.

TRABER M. G., VAN DER VLIET A., REZNICK A. Z., CROSS C. E. Tobacco-related diseases. Is there a role for antioxidant micronutrient supplementation? **Clin Chest Med.** 2000; 21(1): 173-187.

VIEIRA M. Novos valores de referência de normalidade para análise seminal da Organização Mundial da Saúde: como ficamos? **Einstein** 2013; 11(2)263-4

World Health Organization. WHO Laboratory Manual for the Examination and processing of human semen. 5th ed. Geneva: **WHO Press** 2010.

World Health Organization. WHO Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Sperm-Cervical Mucus Interaction , 4th ed. **Cambridge University Press** 1999; 128.

ZHANG E., TAO X., XING W., CAI L., ZHANG B. Effect of Sperm Count on Success of Intrauterine Insemination in Couples Diagnosed with Male Factor Infertility. **Mater Sociomed** 2014; 26 (5):321-323.

## TABLES

Table 1 - Characterization of the sample.

Characteristics	Data
Age (Years) – average $\pm$ DP	37,0 $\pm$ 6,6
BMI (kg/m <sup>2</sup> ) – average $\pm$ DP	27,1 $\pm$ 3,8
Obesity – n(%)	93 (21,1)
Smoking – n(%)	45 (10,0)
Comorbidities in general – n(%)	115 (25,8)
Hypertension	24 (5,0)
Insulin resistance /DM	6 (1,3)
Neoplasia	5 (1,0)
Psychiatric disorder	22 (4,6)
Dyslipidemia	12 (2,5)

Table 2 - Data from semen samples.

Variables	Data
Days of abstinence – average $\pm$ DP	3,65 $\pm$ 1,77
Volume (mL) – average $\pm$ DP	2,84 $\pm$ 1,43
Concentration (x10 <sup>6</sup> ) – md (P25 – P75)	32 (8 – 62)
Motility a+ b (%) – average $\pm$ DP	38,6 $\pm$ 17,5
Cells red. (x10 <sup>6</sup> ) – md (P25 – P75)	2,6 (1,2 – 4,9)
Leukocytes – md (P25 – P75)	0,8 (0,4 – 1,2)
Vitality (%) – média $\pm$ DP	58,4 $\pm$ 15,8
Normal morphology (%) – md (P25 – P75)	10 (6 – 15)
TMSC (x10 <sup>6</sup> ) – md (P25 – P75)	28,9 (5,1 – 73,7)

Table 3 - Differences in the parameter alterations between the 1999 and 2010 WHO classifications.

Alterations	WHO		Absolute Diference (%)	Relative Diference (%)	P
	1999 (n=477)	2010 (n=477)			
Total concentration	163 (34,2)	162 (34,0)	0,2	0,6	1,000
Concentration/ml	170 (35,6)	146 (30,6)	5,0	14,0	<0,001
Motility a + b	310 (65,0)	151 (31,7)	33,3	51,2	<0,001
Morphology	335 (70,2)	50 (10,5)	59,7	85,0	<0,001
Vitality	400 (87,9)	175 (38,5)	49,4	56,2	<0,001
With alteration – 4 general criteria *	401 (84,1)	223 (46,8)	37,3	44,4	<0,001
With at least 2 alterations	293 (61,4)	112 (23,5)	37,9	61,7	<0,001

\* considered that the patient had abnormal groups on any of the four parameters is altered (total concentration, concentration mL, motility and morphology)



Table 4 - Alterations in 477 samples analyzed in accordance with the WHO classifications of 1999 and 2010.

Variables	N	%
Classification WHO 1999		
Total concentration < 40 millions	163	34,2
Concentration/ml < 20 x 10 <sup>6</sup>	170	35,6
Motility a + b < 50%	310	65,0
Morphology < 14%	335	70,2
With alterations – 4 general criteria *	401	84,1
With at least 2 alterations	293	61,4
Classification WHO 2010		
Total concentration < 39 millions	162	34,0
Concentration/ml < 15 x 10 <sup>6</sup>	146	30,6
Motility a + b < 32%	151	31,7
Morphology < 4%	50	10,5
With alterations – 4 general criteria *	223	46,8
With at least 2 alterations	112	23,5
TMSC (x10 <sup>6</sup> )		
< 20	200	41,9
≥ 20	277	58,1

\* The patient General alteration when any of the four parameters (total concentration, concentration ml, motility and morphology) was altered according to the classification.

Table 5 - Association between TMSC and alterations in WHO 1999 and 2010 classifications.

Variables	TMSC (x10 <sup>6</sup> )		p
	< 20	≥ 20	
	(n=200)	(n=277)	
Classification WHO 1999			
Total concentration < 40 millions	161 (80,5)	2 (0,7)	<0,001
Concentration/ ml < 20 x 10 <sup>6</sup>	154 (77,0)	16 (5,8)	<0,001
Motility a + b < 50%	178 (89,0)	132 (47,7)	<0,001
Morphology < 14%	177 (88,5)	158 (57,0)	<0,001
With alterations – 4 general criterias*	200 (100)	201 (72,6)	<0,001
With at least 2 alterations	192 (96,0)	101 (36,5)	<0,001
Classification WHO 2010			
Total concentration < 39 millions	160 (80,0)	2 (0,7)	<0,001
Concentration/ ml < 15 x 10 <sup>6</sup>	140 (70,0)	6 (2,2)	<0,001
Motility a + b < 32%	129 (64,5)	22 (7,9)	<0,001
Morphology < 4%	46 (23,0)	4 (1,4)	<0,001
With alterations – 4 general criterias*	193 (96,5)	30 (10,8)	<0,001
With at least 2 alterations	108 (54,0)	4 (1,4)	<0,001

\* considers that the patient had abnormal groups on any of the four parameters is altered (total concentration, concentration mL, motility and morphology)

Table 6 - Significant associations with motility, morphology, volume, vitality and general (at least one criteria) alterations.

Variables	Motility a + b – 1999		P	Motility a + b – 2010		P
	< 50%	≥ 50%		< 32%	≥ 32%	
Age (years) – average ± DP	37,6 ± 6,8	35,8 ± 6,1	0,005	38,0 ± 6,6	36,5 ± 6,6	0,019
Days of abstinence – average ± DP	3,76 ± 2,02	3,45 ± 1,15	0,035	3,70 ± 2,32	3,63 ± 1,45	0,691
	Morphology (%) – 1999		P	Morphology (%) - 2010		P
	< 14	≥ 14		< 4	≥ 4	
Smoking – n(%)	45 (10,1)	0 (0,0)	1,000	9 (20,5)	36 (8,9)	0,029
Presence of comorbidity – n(%)	82 (26,0)	33 (25,4)	0,982	21 (44,7)	94 (23,6)	0,003
	Volume (ml) – 1999		p	Volume (ml) – 2010		P
	<2	≥ 2		<1,5	≥ 1,5	
Hypertension – n(%)	11 (9,5)	13 (3,6)	0,023	5 (8,3)	19 (4,6)	0,208
Days of abstinence – average ± DP	3,37 ± 1,49	3,74 ± 1,84	0,049	3,60 ± 1,78	3,66 ± 1,77	0,825
	Vitality (%) – 1999		p	Vitality (%) – 2010		P
	<75	≥ 75		<58	≥ 58	
Smoking – n(%)	42 (11,2)	1 (1,9)	0,067	23 (14,2)	20 (7,5)	0,039
Age (years) – average ± DP	37,0 ± 6,5	35,7 ± 5,9	0,177	38,5 ± 7,2	35,8 ± 5,7	<0,001
	criteria WHO 1999			criteria WHO 2010		
	With alteration	Without alteration	p	With alteration	Without alteration	P
Obesity – n(%)	62 (25,4)	31 (15,8)	0,020	52 (24,2)	41 (18,2)	0,157
	2 or more alterations 1999			2 or more alterations 2010		
	Yes	No	p	Yes	No	P
BMI (kg/m <sup>2</sup> ) – average ± DP	27,4 ± 3,8	26,6 ± 3,8	0,025	27,7 ± 3,6	27,0 ± 3,9	0,087

\* The same variables were analyzed by TMSC rating without statistically significant associations (p>0,05).

## FIGURES

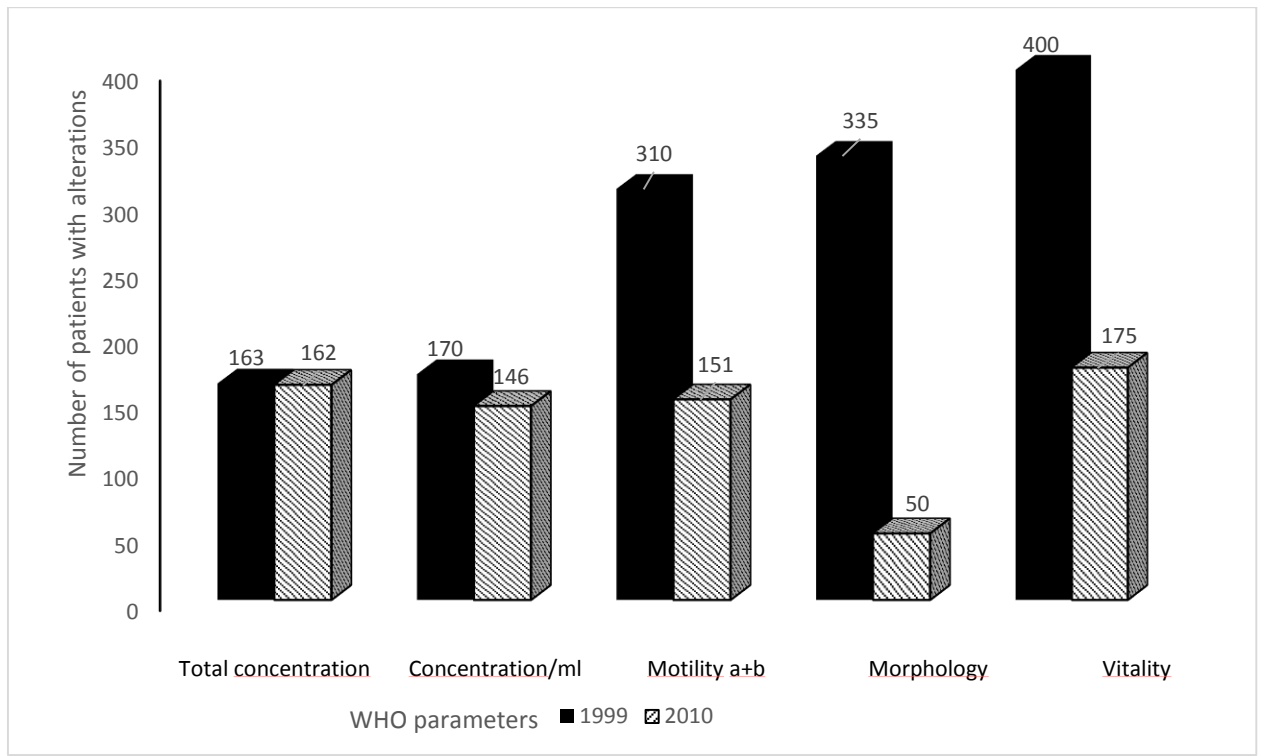


Figure 1 - Parameters according to WHO criteria, 1999 and 2010

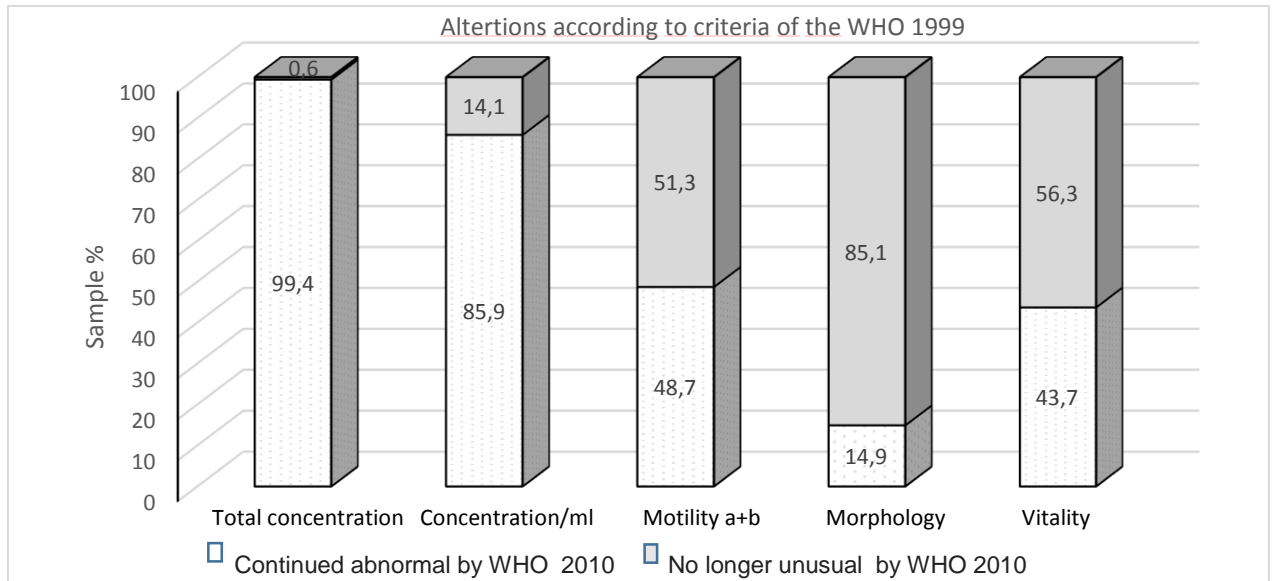


Figure 2 - Evaluation of the samples that have alterations for 1999 and its situation by the 2010 criterion.

## **8 CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Percebe-se que, de um modo geral, os parâmetros se tornaram menos rígidos de 1999 para 2010 alterando significativamente a proporção de indivíduos que deixaram de ser classificados com inférteis a partir dos novos critérios. Conclui-se que as classificações seminais têm mudado frequentemente em função da dificuldade metodológica em se estabelecer quais indivíduos de fato são incapazes de gerar uma gestação naturalmente. E que a classificação baseada no TMSO pode ter algum valor quando se avalia indicação de IUI em que a concentração e motilidade espermática são fundamentais sem, no entanto, definir um indivíduo como fértil ou infértil isoladamente em função de não levar em consideração a morfologia espermática.

O presente estudo tem como limitação o fato de ter avaliado uma amostra em uma clínica de reprodução assistida e não indivíduos em geral férteis e inférteis. Mais estudos são necessários para definirmos e oferecermos tratamentos baseados em evidências para a subfertilidade masculina.

## **9 PERSPECTIVAS FUTURAS**

Com base na revisão da literatura e dos resultados encontrados, acredita-se que mais estudos deveriam ser realizados para avaliar qual das três classificações discutidas melhor se relaciona com a infertilidade masculina avaliando tanto casais com fertilidade comprovada quando casais em tratamentos para infertilidade. Além disso, são necessários mais estudos comparando as três classificações estudadas e avaliando o desfecho gestação nas diferentes terapias de reprodução assistida para auxiliar na indicação da melhor terapia para subfertilidade masculina.

## 10 ANEXOS

### 10.1 ANEXO 1

#### TERMO DE SIGILO QUANTO À IDENTIDADE DOS PACIENTES

Eu, Patrícia De Moraes De Zorzi, comprometo-me a nunca divulgar nomes ou dados dos pacientes dos prontuários por mim revisados que possam identificá-los. Esse termo substituirá o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido uma vez que o estudo baseia-se em revisão de prontuários sem contato pessoalmente com pacientes.

Patrícia De Moraes De Zorzi

## 10.2 ANEXO 2

**DOCUMENTO INFORMANDO CONTATO COM MÉDICO ASSISTENTE**

Declaro que estou ciente do projeto "AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS SEMINAIS DE PACIENTES SUBMETIDOS A TRATAMENTOS EM REPRODUÇÃO HUMANA ASSISTIDA" bem como da existência do termo de confidencialidade em que os revisores se comprometem a não utilizar dados que possam identificar os pacientes e autorizo a revisão e coleta de dados dos prontuários de meus pacientes.

  
Dra. Helena von Eye Corleta  
OBSTETRIZAS 13000  
CIC 421635310-2

  
Dra. Isabela Piva Fuhrmeister  
Ginecologia e Reprodução Humana  
CRM 21736