

Cindy Ferreira Lima

**AVALIAÇÃO PRECOCE DO PERFIL HORMONAL, SEMINAL
E FUNCIONAL DE ESPERMATOZÓIDES DE PACIENTES
OBESOS SUBMETIDOS À CIRURGIA BARIÁTRICA.**

Tese apresentada à Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina, para obtenção do Título de Mestre em Ciências pelo programa de pós graduação em Urologia.

**SÃO PAULO
2013**

Cindy Ferreira Lima

**AVALIAÇÃO PRECOCE DO PERFIL HORMONAL, SEMINAL
E FUNCIONAL DE ESPERMATOZÓIDES DE PACIENTES
OBESOS SUBMETIDOS À CIRURGIA BARIÁTRICA.**

Tese apresentada à Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina, para obtenção do Título de Mestre em Ciências pelo programa de pós graduação em Urologia.

Orientador: Prof. Dr. Renato Fraietta

SÃO PAULO
2013

Lima, Cindy Ferreira

Avaliação precoce do perfil hormonal, seminal e funcional de espermatozoides de pacientes obesos submetidos a cirurgia bariátrica. / Cindy Ferreira Lima. - - São Paulo, 2013.

XV ; 35

Tese (mestrado) – Universidade Federal de São Paulo. Escola Paulista de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Urologia.

Early evaluation of hormonal, seminal and functional sperm profile of patients obese undergoing bariatric surgery.

1. Infertilidade masculina 2.Obesidade 3.Cirurgia bariátrica 4. Bypass Gástrico 5.Perfil hormonal 6.Provas funcionais

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO
ESCOLA PAULISTA DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE CIRURGIA
DISCIPLINA DE UROLOGIA

Chefe do Departamento: Prof. Dr. João Nelson Rodrigues Branco

Chefe da Disciplina: Prof. Dr. Cassio Andreoni Ribeiro

Coordenador do Curso de Pós graduação: Prof. Dr. Agnaldo Pereira Cedenho

Dedicatória

*Em memória de minha avó Lorminda M. A. Ferreira por me ensinar que
sonhos podem se tornar realidade.*

*Aos meus pais Geraldo Lima e Cleide Alves Ferreira por terem mais fé em
minha capacidade do que eu. A meu futuro esposo Reginaldo Condini
Santiago por ser o alicerce que me possibilitou chegar até esse momento.*

Agradecimentos

A **Deus** e a **Nossa Senhora** por mais esse presente concedido.

Ao **Prof. Dr. Renato Fraietta** pela oportunidade e confiança, pela orientação e apoio, e acima de tudo pelo exemplo ético e profissional concedido todos os dias.

Ao **Prof. Dr. Agnaldo Pereira Cedenho**, Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Urologia, pela oportunidade de desenvolver este projeto.

À **Prof^a. Dra. Deborah Montagnini Spaine**, pela confiança, incentivo, atenção e acolhimento. Seu exemplo ético, profissional e humano é um grande motivador em minha construção pessoal e profissional.

Aos **Professores Dr. Ricardo Pimenta Bertola** e **Dr. Edson Guimarães Lo Turco** pela oportunidade de ingressar neste grupo e por toda disponibilidade em orientar e ajudar.

Ao **Dr. Elesiario Marques Caetano Junior** e a **Verônica Fernandez Damasceno** pelo auxílio na seleção dos pacientes e disponibilidade em nos atender sempre que necessário.

À **Dra. Ana Karina Soares Alves** pela atenção, disponibilidade e pronto auxílio no encaminhamento de pacientes.

A todos os **pacientes** que participaram deste estudo e tornaram possível sua realização, sem a ajuda e disponibilidade deles nada seria possível.

Aos profissionais do Laboratório de Andrologia **Danielle Tibaldi, Valéria Barradas, Carolina Homs, Silene Fernandes, Sérgio Antonio Batista Correa** e **Raimundo Gonçalves Moreira**, pela disponibilidade em ajudar na obtenção das amostras e atenção dada há este estudo.

À **Camila Esposito, Daniela Montani, Mariana Camargo, Roberta M. Farielo** e **Clóvis Roberto Abe Constantino** por cada resposta dada sem hesitação e por toda ajuda prestada sem cobrança, a contribuição prestada a esse projeto por vocês é imensurável.

Ao **Prof. Dr. Marcílio Nichi**, pela disponibilidade e ajuda com a técnica de avaliação dos níveis de peroxidação lipídica neste projeto.

A todos os **profissionais e pós graduandos** do Setor Integrado em Reprodução Humana pelo auxílio e atenção disponibilizados.

Aos **amigos, familiares** e a **todos** que me apoiaram e me deram incentivo para construção deste trabalho.

Aos meus irmãos **Sandy Ferreira Lima, Cidy Augusto Ferreira Lima e Lucia Aparecida Santana**, e sobrinhos **Gabriel e Ariane Santana do Carmo** por fazerem a minha vida mais feliz.

À minha tia **Aparecida da Silva Leme** por ter o coração mais solidário que existe no mundo.

Aos meus amigos **Ana Luiza Heissig, Bianca Carvalho, Anderson Vitor, Jefferson Oliveria, Alexandre Bellarmino e Patricia Queirolo** por toda uma história de partilha e cumplicidade, sem vocês minha vida não teria sentido, e com certeza muito menos graça. E a **Fernando Batista da Anunciação** por me ajudar em todos os momentos, pessoas com um coração tão bom são raras.

À minha avó **Lorminda M. A. Ferreira** (*in memoriam*) por ter me ensinado o valor do respeito, da humildade e da doação, ensinamentos de valor inestimável. Agradeço a Deus por ter tido a graça de partilhar minha vida com alguém tão formidável.

Ao meu pai **Geraldo Lima** pelo exemplo de superação, força de vontade e caráter, nunca canso de dizer que sempre será meu herói.

À minha mãe **Cleide Alves Ferreira** pela garra, coragem e força de enfrentar tudo por aquilo que acredita, sempre será minha rainha.

A meu futuro esposo **Reginaldo Conдини Santiago** por ter me mostrado o real significado da palavra felicidade, desde o primeiro momento me acolheu e me deu condições de tornar esse sonho realidade. Obrigada por estar ao meu lado, você é único e cada dia mais te admiro, respeito e amo.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)**, pelo auxílio financeiro, sem o qual não seria possível realizar esta pesquisa.

“A mulher quando está para dar à luz, sente tristeza, porque é chegada sua hora; mas, depois de ter dado à luz a criança, já não se lembra da aflição, por conta da alegria de ter nascido um homem no mundo. Tenho-vos dito isto, para que em mim tenhais paz; no mundo tereis aflições, mas tende bom ânimo, eu venci o mundo.”

(João 16: 21-33)

SUMÁRIO

Dedicatória.....	IV
Agradecimentos.....	V
Lista de figuras.....	X
Lista de tabelas.....	XI
Lista de abreviaturas e símbolos.....	XII
Resumo.....	XV
1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Objetivos.....	3
2 MATERIAL E MÉTODO	4
2.1 Desenho do estudo e Pacientes.....	4
2.1.1 Critérios de inclusão e exclusão	5
2.2 Coleta das amostras.....	5
2.3 Dosagem hormonal	5
2.4 Espermograma	6
2.5 Avaliação da integridade do DNA espermático	6
2.6 Avaliação da atividade mitocondrial espermática	8
2.7 Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico – TBARS	9
2.8 Procedimento cirúrgico	9
2.9 Análise estatística	10
3 RESULTADOS	11
3.1 Idade e Medidas Antropométricas	11
3.2 Análise seminal	11
3.3 Testes funcionais	13
3.4 Dosagem hormonal	13
3.5 Correlação de Pearson e Regressão Linear	14
4 DISCUSSÃO.....	15
5 CONCLUSÃO.....	26
6 ANEXOS	27
7 REFERÊNCIAS.....	30
Abstract	
Apêndice	
Bibliografia consultada	

Lista de Figuras

- Figura 1.** Organograma referente ao fluxo de pacientes recrutados durante o estudo..... 4
- Figura 2.** Imagem de espermatozoides submetidos ao teste de SCD. a: célula grande halo. b: célula médio halo. c: célula pequeno halo. d: célula sem halo. Microscopia de campo claro..... 7
- Figura 3.** Imagem de espermatozóides corados pela 3,3' diaminobenzidina. a: célula classe I (todas as mitocôndrias ativas). b: célula classe II (mais de 50% de mitocôndrias ativas). c: célula classe III (menos de 50% das mitocôndrias ativas). d: célula classe IV (todas as mitocôndrias inativas). Microscopia de contraste de fase (PH3) em aumento de 1000x sob imersão..... 8
- Figura 4.** Imagem ilustrativa das modificações realizadas após cirurgia de BGYR. Retirada de Alila Medical Images - © AMI 10

Lista de Tabelas

Quadro 1 – Valores de sensibilidade e padrão de referência masculina característicos dos hormônios LH, FSH, E₂, PRL, TT e TL 6

Tabela 1 - Dados antropométricos de pacientes pré (T0) e 90 dias após (T1) cirurgia de bypass gástrico em Y Roux. Os dados foram analisados e comparados usando os testes de amostras únicas e pareados T de student ($p < 0,05$) 11

Tabela 2: Análise seminal de pacientes pré (T0) e 90 dias após (T1) cirurgia de bypass gástrico em Y Roux. Os grupos foram comparados, usando os testes pareados t de student ou de Wilcoxon ($p < 0,05$) 12

Tabela 3. Valores da fragmentação de DNA, atividade mitocondrial e níveis de peroxidação lipídica de pacientes pré (T0) e 90 dias após (T1) cirurgia de bypass gástrico em Y Roux. Os grupos foram comparados, usando os testes pareados t de student ou de Wilcoxon ($p < 0,05$) 13

Tabela 4. Valores referentes à dosagem hormonal de TT, FT, E₂, PRL, FSH e LH de pacientes antes (pré) e 90 dias após (pós) cirurgia de bypass gástrico em Y Roux. Os grupos foram comparados, usando os testes pareados t de student ou de Wilcoxon ($p < 0,05$) 14

Lista de abreviaturas e símbolos

ACR TII	Receptores de Activina Tipo II
BGYR	Bypass Gástrico em Y de Roux
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
cm	Centímetro
DAB	3,3'-diaminobenzidina
DE	Disfunção Erétil
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DP	Desvio padrão
dL	Decilitro
DTT	Ditiotreitol
E ₂	Estradiol
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EROS	Espécies reativas de oxigênio
FSH	Hormônio Folículo Estimulante
g	Força centrífuga rotacional (gravidade)
GPx	Glutathione Peroxidase
GnRH	Hormônio Liberador de Gonadotrofina
HCl	Ácido clorídrico
HPG	Hipotálamo – Pituitária – Gônadas
IMC	Índice de Massa Corporal
IC 95%	Intervalo de Confiança de 95% da média
Kg	Kilograma
KH ₂ PO ₄	Fosfato monopotássico
KCl	Cloreto de potássio
L	Litro
LH	Hormônio Luteinizante
LMPA	Agarose de ponto de fusão baixo (do inglês <i>low melting point agarose</i>)
M	Molar
mUI	Mili-Unidade Internacional

MDA	Malondialdeído
mg	Miligrama
mL	Mililitro
mM	Milimolar
m ²	Metro quadrado
N	Newton
Na ₂ EDTA	EDTA dissódico
Na ₂ HPO ₄	Fosfato dissódico
NaCl	Cloreto de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
ng	Nanograma
NH ₄ HCO ₃	Bicarbonato de amônio
nm	Nanômetro
NMPA	Agarose de ponto de fusão normal (do inglês <i>normal melting point agarose</i>)
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	Solução salina tamponada com fosfato
pH	Potencial hidrogeniônico
pg	Picograma
PRL	Prolactina
PH3	Microscopia de contraste fase 3
ssDNA	DNA de cadeia simples
SDS	Dodecil sulfato de sódio (do inglês <i>sodium dodecyl-sulphate</i>)
SCD	Dispersão da Cromatina Espermática
SHBG	Globulina Ligadora de Hormônios Sexuais
SOD	Superóxido Dismutase
SUS	Sistema Único de Saúde
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TBARS	Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico
TBE	Tris-Borato-EDTA
TCA	Ácido Tricloroacético
T0	Tempo 0 – pré cirurgia
T1	Tempo 1 – após 90 dias

TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethane
TL	Testosterona Livre
TT	Testosterona Total
UNIFESP	Universidade Federal de São Paulo
°C	Graus Celsius
µL	Microlitro
µg	Micrograma
%	Porcentagem
>	Maior
≥	Maior ou igual
<	Menor
/	Divisão
*	Diferença estatística significativa
=	Igual

Resumo

Objetivos: Avaliar mudanças no perfil hormonal, seminal e funcional de espermatozóides de homens obesos que foram submetidos à cirurgia bariátrica de bypass gástrico em Y de roux (BGYR). **Métodos:** Estudo prospectivo composto por 12 homens obesos com indicação de cirurgia bariátrica acompanhados por 3 meses após procedimento. Os pacientes realizaram dosagem de testosterona total e livre (TT e TL), estradiol (E₂), prolactina (PRL), hormônios luteinizante e folículo estimulante (LH e FSH). As amostras seminais foram obtidas e analisadas de acordo com as recomendações da Organização Mundial da Saúde (1999) e a morfologia segundo o critério estrito de Kruger (1986). A integridade do DNA nuclear dos espermatozóides foi avaliada pelo ensaio de dispersão da cromatina espermática (SCD). As células foram classificadas de acordo com a morfologia do DNA observada: A) grande halo (alta integridade); B) médio halo (íntegro ou em início de fragmentação); C) pequeno halo (moderada a altamente fragmentado); e D) halo ausente (altamente fragmentado). A atividade mitocondrial foi avaliada por um método colorimétrico, através do qual as células foram classificadas em: classe I (100% de mitocôndrias ativas), classe II (mais de 50% de mitocôndrias ativas), classe III (menos de 50% de mitocôndrias ativas) e classe IV (100% de mitocôndrias inativas). O nível de peroxidação lipídica foi determinado usando-se método baseado na reação de malonaldeído (MDA) com o ácido tiobarbitúrico (TBA). **Resultados:** Foram observados aumento nos níveis de TT e diminuição nos níveis de E₂. Não houve mudanças em TL, FSH e PRL. Quanto aos parâmetros seminais foi observada diminuição no número de células redondas. Não houve mudanças nos níveis de peroxidação lipídica, integridade de DNA e atividade mitocondrial. Tendências estatísticas foram observadas quanto ao aumento nos níveis de LH, contagem total e contagem total de espermatozóides móveis. **Conclusões:** A perda de peso através de BGYR tem impacto positivo sobre o perfil hormonal reprodutivo, mas sem comprovação estatística de mudanças nos parâmetros seminais e funcionais.

Palavras-chave: Infertilidade masculina; Obesidade; Cirurgia bariátrica; Bypass Gástrico; Perfil hormonal; Provas funcionais;

1 INTRODUÇÃO

Na era da informação, do avanço tecnológico e do crescimento profissional, problemas de saúde complexos como obesidade e infertilidade têm tido aumento substancial, e pouco se sabe a respeito da ligação entre esses dois fatores, principalmente no que se refere ao fator masculino [8,50]. Além do aumento das queixas de infertilidade, problemas como estresse, ansiedade, sobrepeso e obesidade têm crescido em proporções alarmantes [58,59]. A correria do dia-a-dia tem modificado os hábitos de vida do ser humano, o que muitas vezes pode ter influência direta sobre a fertilidade e a ocorrência de obesidade, como fatores isolados. A má alimentação e a falta de exercícios parecem ter influência direta sobre a ocorrência de obesidade no mundo [41], por sua vez, o adiamento da concepção, o estilo de vida e vícios sociais, como o uso de álcool e tabaco estão entre possíveis fatores que podem levar ao declínio do potencial reprodutivo de homens e mulheres [2,24,26,83]. No entanto, a obesidade parece ter relação e desponta como possível agravante da infertilidade no mundo [39,43].

A infertilidade pode ser definida como ausência de gestação após um ano de tentativas, com frequência sexual bem distribuída ao longo do ciclo menstrual, sem a utilização de métodos contraceptivos [12,65,88]. É freqüente a procura de pacientes com sobrepeso ou obesidade a clínicas de reprodução assistida. Em mulheres, o aumento de peso está associado ao aumento nas taxas de síndrome dos ovários policísticos, distúrbios menstruais, infertilidade, abortos espontâneos, falhas em tratamentos de reprodução assistida e múltiplas complicações na gravidez, como diabetes gestacional, pré-eclampsia e macrosomia fetal [10,15,54,85]. Em homens, a associação ainda é pouco caracterizada [21,22,30,81], mas alterações seminais e no perfil de hormônios do eixo hipotálama-pituitária-gônadas (HPG) foram observadas [7,40,48,60,64].

O sobrepeso e a obesidade estão entre as maiores causas de preocupação em saúde pública no mundo. A Organização Mundial da Saúde (OMS)(2006) [91] relatou que 1,6 bilhão de pessoas no mundo estão acima do peso, e que aproximadamente 300 milhões já são clinicamente obesas. Muitos estudiosos acreditam que hábitos alimentares, estilo de vida e características sócio demográficas são responsáveis por essa epidemia de ganho excessivo de peso [55,76], mas já se tem conhecimento na literatura de que fatores genéticos e

hormonais também estão diretamente ligados ao estabelecimento da obesidade [60]. O aumento de peso corporal está associado ao desenvolvimento de uma série de desordens crônicas como hipertensão, doenças cardiovasculares, diabetes mellitus tipo II, síndrome metabólica [22,81,86], e estudos relacionando obesidade e infertilidade já afirmam sua relação negativa.

Para o tratamento de redução do excesso de peso temos programas com dietas de baixa caloria, exercícios físicos e o uso de medicamentos como primeira escolha [61]. Nos casos em que tais intervenções falhem na perda ou na manutenção do peso perdido, quando associado a valores de IMC ≥ 40 kg/m² ou ≥ 35 kg/m² com comorbidades é indicada a intervenção cirúrgica [16,73]. Os tipos de cirurgia bariátrica existentes são classificados em restritivos e associados (restritivos e mal absorptivos) como é o caso do Bypass Gástrico em Y de Roux (BGYR) que hoje é o procedimento mais realizado com alto grau de eficiência na perda de peso [3,13,87,93], assim como pouco se sabe a respeito dos efeitos da obesidade sobre a fertilidade, menos ainda sabemos a respeito do impacto da perda de peso cirúrgica sobre o organismo do ponto de vista reprodutivo. Essa relação até o momento é pouco estudada e há poucas informações disponíveis a respeito, sendo que, em muitos pontos, há divergências quanto aos resultados obtidos (49,64,65,75).

Diante de tal constatação, o presente trabalho teve o intuito de verificar o impacto da perda de peso sobre o potencial fértil de pacientes masculinos obesos submetidos à cirurgia de BGYR, através da análise dos níveis hormonais, parâmetros seminais e provas funcionais nos espermatozoides.

1.1 OBJETIVOS

A proposta deste estudo foi avaliar em pacientes obesos submetidos à cirurgia bariátrica de Bypass Gástrico em Y de Roux, os efeitos da perda de peso sobre:

1. O perfil dos hormônios do eixo Hipotálamo-Pituitária-Gônadas;
2. Parâmetros seminais;
3. Os níveis de peroxidação lipídica do plasma seminal;
4. Os aspectos funcionais dos espermatozoides quanto à:
 - a. Avaliação da integridade do DNA dos espermatozoides; e
 - b. Avaliação da atividade mitocondrial dos espermatozoides;

2 MATERIAL E MÉTODO

Este estudo foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), número 1305/10.

2.1 Desenho do Estudo e Pacientes

Para realização deste estudo foram recrutados 22 homens obesos com indicação para cirurgia de Bypass Gástrico Em Y De Roux (BGRY) atendidos pelo Ambulatório de Gastroenterologia Cirúrgica do Hospital São Paulo - Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP). No primeiro contato, 6 foram excluídos por serem vasectomizados e 1 se recusou a participar do estudo por motivos pessoais. Depois de explicado sobre os objetivos do projeto e procedimentos necessários para a participação, 15 pacientes aceitaram participar do estudo e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). Foram então submetidos à coleta de amostras de sangue e sêmen antes (T0) e após 90 dias (T1) da realização da cirurgia. Os pacientes foram acompanhados através de duas etapas de análise correspondentes ao período de coleta, compreendendo em cada uma delas os testes de dosagem hormonal, espermograma e testes funcionais. No entanto, antes do retorno, 2 pacientes mudaram-se de cidade e 1 realizou vasectomia, sendo assim 12 pacientes homens participaram efetivamente de todo protocolo, como descrito na **figura 1**.

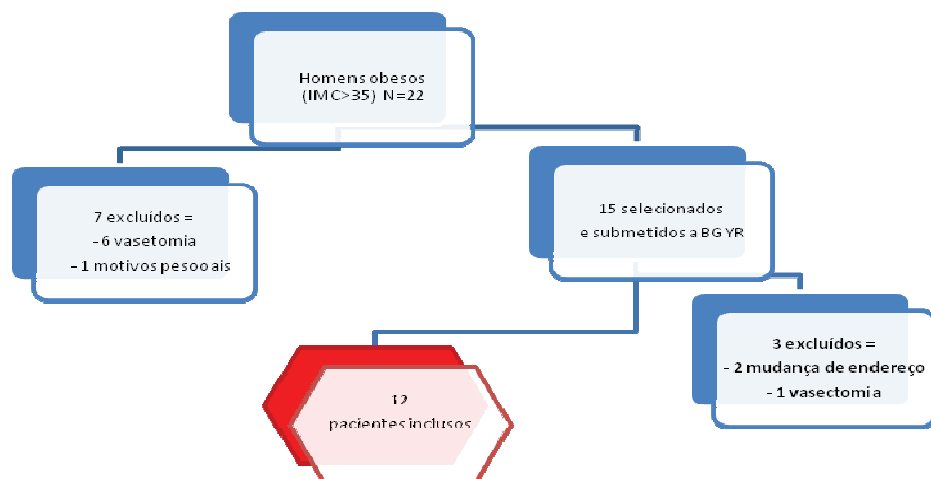


Figura 1. Organograma referente ao fluxo de pacientes recrutados durante o estudo.

2.1.1 Critérios de Inclusão e Exclusão.

Como os pacientes foram seus próprios controles não houve a necessidade de divisão entre grupos, o que possibilitou a inclusão de todos os pacientes do sexo masculino com idade entre 20 e 55 anos, que tinham indicação de cirurgia bariátrica com base nos valores do Índice de Massa Corpórea (IMC), independentemente da existência de outras doenças associadas, estado civil, história de infertilidade ou paternidade prévia.

O IMC é a fórmula mais utilizada para medir a massa gorda do corpo, o cálculo é realizado através da divisão do peso do indivíduo em kilogramas pelo quadrado da altura em metros (kg/m^2) [14]. O IMC é estratificado em eutrófico ($\text{IMC} < 25 \text{ kg}/\text{m}^2$), sobrepeso ($\text{IMC} \geq 25 \text{ kg}/\text{m}^2$ e $< 30 \text{ kg}/\text{m}^2$), obesidade ($\text{IMC} \geq 30 \text{ kg}/\text{m}^2$) e obesidade mórbida ($\text{IMC} \geq 40 \text{ kg}/\text{m}^2$) [24,52]. Quando o paciente apresenta $\text{IMC} \geq 40 \text{ kg}/\text{m}^2$ ou $\text{IMC} \geq 35 \text{ kg}/\text{m}^2$ associado à comorbidades o procedimento cirúrgico é indicado para tratar a obesidade.

2.2 Coleta das Amostras

A amostra de sangue foi coletada no mesmo dia da amostra de sêmen, através de punção venosa. A coleta de sangue foi realizada entre 07:00 e 08:00 horas da manhã, após jejum de 12 horas. A coleta de sêmen foi feita por masturbação, após um período de 2 a 5 dias de abstinência ejaculatória, em área anexa ao laboratório de urologia da UNIFESP. A amostra pré cirúrgica foi coletada com no máximo 15 dias de antecedência a cirurgia, e a pós cirúrgica com no máximo 115 dias após cirurgia.

2.3 Dosagem Hormonal

A dosagem hormonal foi realizada através do soro extraído a partir de uma amostra de sangue. Esta amostra foi centrifugada para obtenção do soro, e este ficou armazenado a $- 80^\circ \text{C}$ até o momento da análise. Foi dosado o hormônio luteinizante (LH), hormônio folículo estimulante (FSH), estradiol (E_2), prolactina (PRL), testosterona total (TT) e livre (TL), e para tais dosagens foi utilizado um sistema automatizado (Modular E, Roche Diagnostics GmbH) que utiliza um

imunoensaio quimioluminescente. Segue abaixo **quadro 1** com valores referentes à sensibilidade e padrão de referência masculina de cada hormônio.

Quadro 1 – Valores de sensibilidade e padrão de referência masculina característicos dos hormônios LH, FSH, E₂, PRL, TT e TL.

	Sensibilidade	Padrão de referência masculina
LH (mUI/mL)	0,07	1,50 – 9,30
FSH (mUI/mL)	0,30	1,60 – 8,00
E ₂ (pg/mL)	11,8	até 39,8
TT (ng/dL)	12	175 – 781
TL (pg/mL)	0,09	3,4 – 26,5
PRL (ng/mL)	0,5	2,1 – 17,7

2.4 Espermograma

Após a liquefação da amostra coletada, a análise seminal foi realizada de acordo com as recomendações da Organização Mundial da Saúde [89] e a morfologia segundo critério estrito de Kruger [45]. Uma alíquota do sêmen foi submetida à análise seminal convencional e o restante foi utilizado para os testes de peroxidação lipídica, fragmentação de DNA e atividade mitocondrial espermática, sendo o excedente descartado de forma apropriada.

2.5 Avaliação da Integridade do DNA Espermático

Para avaliar a integridade do DNA nuclear do espermatozoide foi realizado o teste de Dispersão da Cromatina Espermática (SCD) conforme proposto por Fernández et al.[25]. Quando as células somáticas ou espermatozoides com DNA não fragmentado são imersos numa matriz de agarose e diretamente expostos a soluções de lise, os núcleos com DNA íntegro desproteinizados mostram halos extensos devido à dispersão do DNA, os quais correspondem aos *loops* de DNA relaxados ligados à estrutura residual nuclear. Porém, quando há quebras na estrutura do DNA, a expansão dos halos é inviabilizada, não possibilitando sua observação através de microscopia [25].

Alíquotas de sêmen fresco foram diluídas em 1% Agarose Low Melting Point (LMPA) (GE Healthcare, Amersham, Inglaterra) para obter concentrações de espermatozoides que variaram entre 5 e 10 milhões / mL. Alíquotas de 50 µl da

mistura foram pipetados para uma lâmina de microscopia (26x76mm, Precision Glass Line, China) preparada previamente (dia anterior e mantida a temperatura ambiente) com 1000µL de Agarose Normal Melting Point (NMPA) (GE Healthcare, Amersham, Inglaterra) 1% em TBE (0,089M Tris [GE Healthcare, Amersham, Inglaterra], 0,089M borato [GE Healthcare, Amersham, Inglaterra], 0,002M Na₂-EDTA [GE Healthcare, Amersham, Inglaterra]), coberta com uma lamínula (24 por 60 mm) e guardada a 4°C por 4 minutos para solidificar. Assim como no ensaio cometa, a matriz de agarose permite ao SCD o trabalho com o espermatozoide fixo a uma lâmina num ambiente de suspensão líquida. As lamínulas foram cuidadosamente removidas e as lâminas foram imersas imediatamente na posição horizontal em tabuleiro com solução recentemente preparada de ácido desnaturação (0,08 N HCl) durante 7 minutos a 22°C no escuro para produzir fi tas de DNA de cadeia simples (ssDNA) possibilitando observar a quebra de DNA. A desnaturação foi então cessada e as proteínas foram removidas por uma transferência das lâminas para um tabuleiro com solução de neutralização e lise 1 (0,4 M Tris, 0,8 M de DTT, SDS a 1%, e de 50 mM EDTA, pH 7,5) durante 10 minutos à temperatura ambiente, seguida por incubação em solução de neutralização e de lise 2 (0,4 M Tris, NaCl 2 M, e SDS a 1%, pH 7,5) durante 5 minutos à temperatura ambiente. As lâminas foram lavadas cuidadosamente em TBE (0,09 M Tris-borato 0,002 M e EDTA, pH 7,5) durante 2 minutos, desidratadas sequencialmente em banhos de etanol 70%, 90% e 100% (2 minutos cada) e secas ao ar. As células foram coradas com o reagente de coloração hematológica Panótico (Laborclin produtos para laboratório Ltda) para microscopia de campo claro, avaliadas ao microscópio sendo que 200 células foram contadas segundo a morfologia: A) grande halo; B) médio halo; C) pequeno halo; e D) halo ausente.

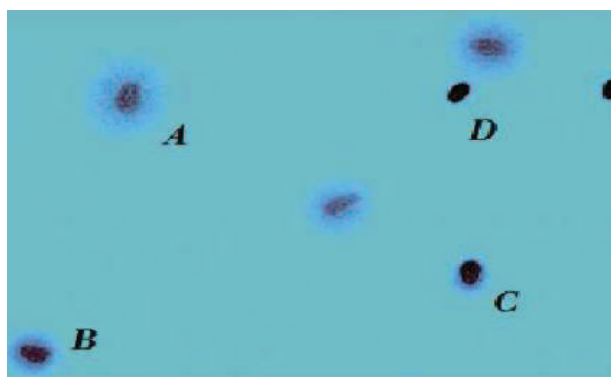


Figura 2. Imagem de espermatozoides submetidos ao teste de SCD. a: célula grande halo. b: célula médio halo. c: célula pequeno halo. d: célula sem halo. Microscopia de campo claro.

2.6 Avaliação da Atividade Mitocondrial Espermática

A atividade mitocondrial foi avaliada pelo método de coloração por 3,3'-diaminobenzidina (DAB), proposto por Hrudka [36]. Esta técnica baseia-se na oxidação da 3,3'-diaminobenzidina pela enzima citocromo c oxidase, na qual o reagente é polimerizado e depositado na bainha mitocondrial ao longo da peça intermediária dos espermatozoides [36].

Inicialmente, uma alíquota de sêmen fresco foi adicionada a uma solução contendo 1mg/mL de DAB em PBS (137mM NaCl, 2,7mM KCl, 4,3mM Na₂HPO₄, 1,4mM KH₂PO₄) em uma proporção de 1:1 a 1:3 e incubada por 1 hora em banho-maria a 37°C no escuro. Para evitar coloração inespecífica da peça intermediária, foram realizados controles negativos utilizando uma alíquota de sêmen previamente inativada a 70°C por 5 minutos. Após o período de incubação, foram preparados 2 esfregaços de 10µL em lâminas de microscopia (Precision Glass Line, China). Depois de secas, as lâminas foram fixadas em formaldeído 10% por 10 minutos. As lâminas foram deixadas em temperatura ambiente para secarem novamente.

Foram contadas 200 células em um aumento de 1000x em imersão utilizando-se microscopia de contraste de fase (PH3) e a classificação foi realizada de acordo com a escala de classes proposta por Hrudka (1987): classe I (100% da peça intermediária corada), classe II (mais de 50% da peça intermediária corada), classe III (menos de 50% da peça intermediária corada) e classe IV (ausência de coloração na peça intermediária) (figura 2). As lâminas foram observadas em um microscópio Nikon E400 equipado com contraste de fase (Nikon, Japão).

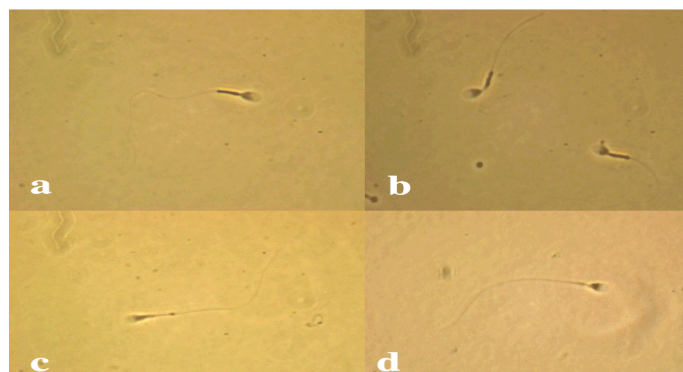


Figura 3. Imagem de espermatozoides corados pela 3,3' diaminobenzidina. a: célula classe I (todas as mitocôndrias ativas). b: célula classe II (mais de 50% de mitocôndrias ativas). c: célula classe III (menos de 50% das mitocôndrias ativas). d: célula classe IV (todas as mitocôndrias inativas). Microscopia de contraste de fase (PH3) em aumento de 1000x sob imersão.

2.7 Substâncias Reativas Ao Ácido Tiobarbitúrico – TBARS

O nível de peroxidação lipídica causado pela ação das espécies reativas de oxigênio (EROS) das amostras foi quantificado pela técnica TBARS, de acordo com um protocolo descrito por Ohkawa et al. (1979) [59]. O método baseia-se na reação de duas moléculas de ácido tiobarbitúrico (TBA) com uma molécula de malonaldeído (MDA), em altas temperaturas e pH baixo, resultando em um complexo – MDA (TBA)₂ - avermelhado com absorvância máxima a 532nm e que pode ser quantificado com um espectrofotômetro.

A fim de evitar reações inespecíficas causadas por proteínas, 500µL de plasma seminal foram adicionados a 1000µL de uma solução 10% (v:v) de ácido tricloroacético (TCA 10%) e centrifugados a 16.100g a 15°C. Após 15 minutos de centrifugação, 500µL do sobrenadante juntamente com 500µL de ácido tiobarbitúrico 1% (TBA 1%) em 0.05N de hidróxido de sódio, foram mantidos por 10 minutos em banho-maria (100°C) em tubos de vidro. A seguir, as amostras foram resfriadas em gelo (0°C) para cessar a reação química.

O TBARS foi então quantificado utilizando-se um espectrofotômetro em um comprimento de onda de 532 nm. Uma curva padrão foi previamente preparada com uma solução padrão de malonaldeído para posterior comparação dos resultados. A concentração de TBARS foi determinada usando o valor de $1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. O index de peroxidação lipídica foi descrito como nanogramas de TBARS/mL de sêmen.

2.8 Procedimento Cirúrgico

A cirurgia de Bypass Gástrico em Y de Roux, consiste na formação de uma bolsa gástrica proximal, de modo que o estômago faça parte de uma nova conformação do aparelho digestório em forma de Y, com saída direto para o intestino delgado. Essa separação do estômago proximal, das partes remanescentes é feita por grampos inseridos cirurgicamente. Essa técnica pode ser feita tanto por laparotomia quanto por laparoscopia [93].

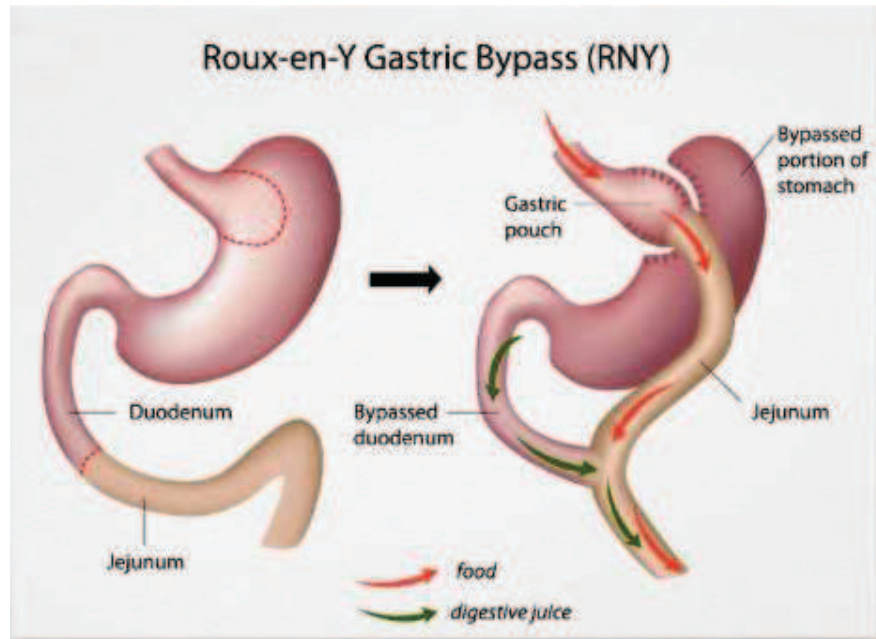


Figura 4. Imagem ilustrativa das modificações realizadas após cirurgia de BGYR. Retirada de Alila Medical Images - © AMI.

2.9 Análise Estatística

A análise estatística foi realizada pelo software SPSS (PASW) 18.0. Inicialmente, o teste Kolmogorov-Smirov foi realizado para testar a normalidade de distribuição dos dados. As variáveis normais foram então comparadas usando o teste t de student para amostras pareadas. As variáveis que não possuíam normalidade foram analisadas pelo teste não paramétrico de Wilcoxon para amostras pareadas. Para as variáveis que apresentaram valores de relevância estatística, foi realizado teste de correlação de Pearson para verificar possíveis correlações. Quando encontrada correlações significativas, foram realizados teste de regressão linear. Um alfa de 5% foi adotado.

3 RESULTADOS

3.1 Idade e Medidas Antropométricas

Os valores de idade e medidas antropométricas de peso e IMC estão apresentados na **tabela 1**. Todos os pacientes submetidos à BGYR apresentaram perda de peso ($p=0,000$) e redução de IMC ($p=0,000$) quando comparados os dados referentes ao T0 e T1.

Tabela 1 – Idade e dados antropométricos de pacientes pré (T0) e 90 dias após (T1) cirurgia de bypass gástrico em Y Roux. Os dados foram analisados e comparados usando os testes de amostras únicas e pareados T de student ($p < 0,05$).

	T0	T1	p
Idade (Anos)			
Média; DP	34,5 ; 7,8		
IC 95%	[29,6 ; 39,5]		
Peso (kg)			
Média; DP	139,3 ; 23,0	107,7 ; 14,1	<0,000*
IC 95%	[124,6 ; 154,0]	[98,7 ; 116,7]	
IMC (kg/m²)			
Média; DP	43,7 ; 7,2	33,5 ; 5,1	<0,000*
IC 95%	[39,1 ; 48,0]	[30,3 ; 36,8]	

DP – desvio padrão; IC95% - Intervalo de confiança de 95% da média; * – diferença significativa

3.2 Análise Seminal

Os resultados referentes a tempo de abstinência ejaculatória e análise seminal estão apresentados na **tabela 2**. Apenas a diminuição da presença de células redondas após BGYR apresentou relevância estatística ($p=0,025$) na análise seminal. Alguns parâmetros não alcançaram valores estatísticos significativos, mas apresentaram tendência estatística, como é o caso da motilidade c ($p=0,081$), do aumento da concentração de espermatozoides ($p=0,086$), contagem total de espermatozoides ($p=0,056$), total de espermatozoides móveis ($p=0,062$) e total de espermatozoides móveis progressivos ($p=0,085$).

Tabela 2: Análise seminal de pacientes pré (T0) e 90 dias após (T1) cirurgia de bypass gástrico em Y Roux. Os grupos foram comparados utilizando os testes pareados T de student ou de Wilcoxon ($p < 0,05$).

	T0	T1	p
Abstinência (dias)			
Média; DP	4,0; 1,1	3,7; 1,1	0,217
IC 95%	[3,7; 4,3]	[3,2; 4,1]	
Volume (mL)			
Média; DP	2,2; 0,7	2,3; 0,7	0,731
IC 95%	[1,7; 2,7]	[1,8; 2,8]	
Motilidade a+b (%)			
Média; DP	50,4; 18,0	51,1; 13,9	0,797
IC 95%	[38,3; 62,5]	[41,7; 60,5]	
Motilidade c (%)			
Média; DP	4,3; 2,9	6,0; 2,7	0,081
IC 95%	[2,4; 6,1]	[4,3; 7,8]	
Motilidade d (%)			
Média; DP	41,0; 20,5	38,6; 17,7	0,343
IC 95%	[28,4; 54,1]	[27,3; 49,9]	
Concentração ($\times 10^6/\text{mL}$)			
Média; DP	50,1; 77,1	62,6; 92,6	0,086
IC 95%	[1,1; 99,1]	[3,7; 121,4]	
Contagem total ($\times 10^6$)			
Média; DP	86,9; 112,4	123,5; 156,5	0,056
IC 95%	[15,5; 158,3]	[24,0; 223,0]	
Contagem Total Móveis ($\times 10^6$)			
Média; DP	53,9; 66,8	79,4; 103,1	0,062
IC 95%	[11,4; 96,3]	[13,9; 144,9]	
Contagem Total Móveis Progressivos ($\times 10^6$)			
Média; DP	50,1; 60,8	71,2; 92,7	0,085
IC 95%	[11,5; 96,3]	[12,2; 130,1]	
Morfologia (%)			
Média; DP	4,2; 3,9	5,0; 3,5	0,288
IC 95%	[1,7; 6,7]	[2,8; 7,3]	
Células redondas (%)			
Média; DP	4,7; 8,9	1,7; 1,8	0,025*
IC 95%	[0,3; 32,5]	[0,1; 6,3]	
Neutrófilos ($\times 10^6/\text{mL}$)			
Média; DP	3,9; 8,5	1,0; 1,5	0,130
IC 95%	[0,0; 30,0]	[0,0; 5,2]	

DP – desvio padrão; IC95% - Intervalo de confiança de 95% da média; * – diferença significativa

3.3 Testes Funcionais

Os resultados de avaliação de integridade de DNA, da atividade mitocondrial dos espermatozoides e dos níveis de peroxidação lipídica estão apresentados na **tabela 3**. Nenhum resultado com relevância estatística ou tendência estatística foi obtido entre os parâmetros analisados.

Tabela 3. Valores da fragmentação de DNA espermático, atividade mitocondrial e níveis de peroxidação lipídica de pacientes antes (T0) e 90 dias após (T1) cirurgia de bypass gástrico em Y Roux. Os grupos foram comparados, usando os testes pareados T de student ou de Wilcoxon ($p < 0,05$).

	T0	T1	p
SCD A+B (%)			
Média; DP	45,5; 16,9	48,3; 17,4	0,198
IC 95%	[34,7; 56,2]	[37,2; 59,3]	
SCD C+D (%)			
Média; DP	46,1; 17,1	43,3; 16,0	0,198
IC 95%	[35,3; 57,0]	[33,1; 53,5]	
DAB I (%)			
Média; DP	2,3; 5,0	0,9; 2,3	0,144
IC 95%	[0; 11]	[0; 8]	
DAB II (%)			
Média; DP	30,5; 17,8	34,0; 19,6	0,364
IC 95%	[19,2; 41,9]	[21,6; 46,5]	
DAB III (%)			
Média; DP	40,7; 18,4	35,0; 16,1	0,137
IC 95%	[29,0; 52,4]	[13,2; 30,1]	
DAB IV (%)			
Média; DP	18,0; 10,7	21,6; 13,3	0,133
IC 95%	[11,1; 24,8]	[13,2; 30,1]	
[MDA] (ng/mL)			
Média; DP	286,1; 46,9	272,8; 37,3	0,328
IC 95%	[256,3; 315,9]	[249,1; 296,6]	

DP – desvio padrão; IC95% - Intervalo de confiança de 95% da média; * – diferença significativa

3.4 Dosagem Hormonal

Os valores referentes às dosagens hormonais de testosterona total (TT), testosterona livre (TL), estradiol (E_2), prolactina (PRL), FSH e LH estão apresentados na **tabela 4**. Os níveis de testosterona total apresentaram aumento ($p=0,025$) e os de estradiol diminuição ($p=0,001$) após a realização de BGYR. Os

níveis de LH também apresentaram aumento ($p=0,55$), porém alcançaram apenas valores de tendência estatística.

Tabela 4. Valores referentes à dosagem hormonal de TT, TL, E₂, PRL, FSH e LH de pacientes antes (T0) e 90 dias após (T1) cirurgia de bypass gástrico em Y Roux. Os grupos foram comparados, usando os testes pareados t de student ou de Wilcoxon ($p < 0,05$).

	T0	T1	p
Testosterona total (ng/dL)			
Média; DP	230,0; 91,8	325,6; 128,3	0,025*
IC 95%	[171,7; 288,4]	[244,1; 407,2]	
Testosterona Livre (ng/mL)			
Média; DP	6,1; 1,9	7,4; 2,5	0,101
IC 95%	[4,9; 7,4]	[5,8; 9,0]	
Estradiol (pg/mL)			
Média; DP	32,5; 10,1	23,3; 10,9	<0,001*
IC 95%	[26,7; 39,0]		
Prolactina (ng/mL)			
Média; DP	5,1; 2,2	5,7; 2,5	0,188
IC 95%	[3,6; 6,6]	[4,1; 7,3]	
FSH (mUI/mL)			
Média; DP	4,5; 1,8	4,4; 1,6	0,804
IC 95%	[3,4; 5,7]	[3,4; 5,5]	
LH (mUI/mL)			
Média; DP	4,7; 1,0	5,6; 1,7	0,055
IC 95%	[4,0; 5,4]	[4,5; 6,7]	

DP – desvio padrão - IC 95% - Intervalo de confiança de 95% da média - * – diferença significativa

3.6 Correlação de Pearson e Regressão Linear

Foram realizados teste de correlação entre as variáveis IMC, TT, E2 e células redondas, que apresentaram valores de relevância estatística ao teste T de student para amostras pareadas, no entanto, foram encontradas correlações significativas nas variáveis descritas abaixo:

- Correlação entre IMC e E2 - ($R^2 = 0,601$ e $p < 0,000$) e;
- Correlação entre IMC e células redondas - ($R^2 = 0,197$ e $p = 0,030$)

4 DISCUSSÃO

Com o aumento da incidência de obesidade há níveis alarmantes sobre a população mundial [34,65,73], cada vez mais se fazem necessárias investigações a respeito de seu impacto sobre o organismo de maneira global. Entre os tratamentos propostos para o sobrepeso e a obesidade, encontram-se dietas de baixa caloria, exercícios físicos, medicamentos [61] e nos casos em que tais intervenções são ineficazes para a redução e a manutenção do peso, há indicação de tratamento cirúrgico [16,73]. Entre os tratamentos cirúrgicos para a obesidade, o mais realizado atualmente é o Bypass Gástrico em Y de roux (BGYR) [13,87].

Em todo o mundo é possível observar o aumento na incidência de obesidade entre crianças, jovens e adultos, o que tornou essa doença um problema de saúde pública mundial com reflexos sobre a qualidade de vida das pessoas e também sobre a economia de muitos países [60]. Hinz et al., (2010) [34] relataram que, entre a população americana, 54% das mulheres e 51% dos homens são obesos. No Brasil, estimativas mostram que, de 1975 a 2003 houve um aumento de 255% na incidência de sobrepeso e obesidade na população [66] e em um estudo publicado recentemente, os autores Moura and Claro (2012) [55] relataram em seus resultados que a incidência passou de 10,8% em adultos em 2006, para 13,5% em 2009, com aumento na prevalência de 28% para mulheres e 22% para homens durante o período de avaliação. O número de pacientes nos EUA que necessitaram de cirurgia bariátrica passou de 16.000 em 1998 para 103.000 em 2003 [37,74]. No Brasil, o Sistema Único de Saúde (SUS), passou a cobrir os custos referentes a cirurgias bariátricas em 1999 e, entre 2000 e 2006, o número de cirurgias aumentou cerca de 6 vezes, atingindo uma marca de 2.500 cirurgias anuais em 2006 [72].

No entanto, mesmo com fatos que comprovam essa pandemia, de maneira geral, sabe-se muito pouco sobre as conseqüências a médio e longo prazo de tratamentos para redução e manutenção do peso em indivíduos obesos. Os impactos que esses tratamentos podem ter sobre o organismo ainda são relativamente novos, pouco estudados e/ou desconhecidos [65].

Embora no mundo moderno a maternidade não seja mais o único objetivo prioritário das mulheres, a continuação da família através dos filhos tem papel singular e em destaque na vida dos casais. Entretanto, a obesidade cada vez mais acomete homens e mulheres jovens, e já se tem conhecimento sobre a relação

negativa desta com a fertilidade em ambos os sexos, sendo que nos últimos 30 anos o número de homens obesos em idade reprodutiva tem triplicado, o que coincide com o aumento na ocorrência de infertilidade masculina [60].

Pouco se sabe a respeito da relação *obesidade versus fertilidade masculina* [21,24], e menos ainda a respeito da relação *obesidade versus cirurgia bariátrica versus fertilidade masculina* [87,93]. Neste cenário, temos muitos dados controversos na literatura a respeito do perfil hormonal [64], parâmetros seminais e funcionais de espermatozoides [65]. Há diferenças entre os procedimentos cirúrgicos bariátricos e os efeitos da perda de peso no organismo por cada tipo de cirurgia podem ser diferentes.

Os tipos de cirurgia bariátrica são classificados em restritivos como a banda gástrica ajustável e balão gástrico; e associados (restritivos e mal absorptivos) como o BGYR. Entre os tipos de cirurgia bariátrica realizados atualmente, o BGYR é o mais freqüente devido á sua grande eficácia na perda e manutenção de peso em longo prazo [3,93]. Esta operação resulta em uma incisão limitante formando uma bolsa gástrica proximal, onde a parte proximal do estômago é ligada ao intestino delgado distal, inativando o duodeno e o intestino delgado proximal. O efeito esperado após a cirurgia é uma redução drástica na absorção de nutrientes e por conseqüência, rápida redução de peso. Embora esta operação ofereça bons resultados na redução de peso em obesos mórbidos, a má absorção de nutrientes pode acarretar uma série de efeitos sobre o organismo a curto e longo prazo, tanto do ponto de vista fisiológico como reprodutivo [44,62,93]. Sua indicação deve ser realizada apenas em casos de comprometimento da saúde devido às conseqüências que pode acarretar ao indivíduo, e não apenas por motivos estéticos [70]. Mas para entender os possíveis impactos da perda de peso através da cirurgia de BGYR, é necessário conhecer os impactos que a obesidade tem sobre o organismo do ponto de vista reprodutivo.

A obesidade afeta de maneira negativa o eixo hipotálamo – pituitária - gônadas (HPG) [15,60] e devido a esse desequilíbrio, alterações hormonais são freqüentes em indivíduos obesos de ambos os sexos. A literatura refere diminuição de TL e TT em sujeitos obesos [7,15,40,92], alguns autores referem aumento nos níveis de E2 e PRL [40,57] e diminuição nos níveis de FSH e LH circulantes [40] entre outros hormônios que também se apresentam alterados, mas não é o foco deste estudo.

A região média basal do hipotálamo de um homem adulto é responsável por secretar o hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH), o qual interage com receptores acoplados a proteína G localizada na membrana plasmática dos gonadotrofos epifisários estimulando a liberação de LH e FSH. O LH uma vez liberado se liga a receptores na membrana plasmática das células de Leydig resultando na síntese de enzimas que converterão andrógenos em testosterona [28]. O FSH por sua vez é regulado por feedback comandado por duas glicoproteínas, activina e inibina. A activina se liga aos receptores de activina tipo II (ACR TII) na pituitária e estimula a secreção de FSH que por sua vez, atua sobre as células de Sertoli e tem função sobre a espermatogênese. A inibina realiza feedback negativo, ligando-se aos ACR TII e assim reduzindo a ligação de activina na pituitária, dessa forma, reduzindo a secreção de FSH [17]. A regulação do nível de FSH circulante é dependente da quantidade de células germinativas nos testículos, e sua dosagem tem sido utilizada juntamente com a de inibina B como marcador da espermatogênese [28].

Por sua vez, a testosterona produzida pelas células de Leydig pode ser encontrada nas formas livre, ligada à albumina ou à globulina ligadora de hormônios sexuais (SHBG) [52]. Cerca de 2% da TT corresponde à fração livre do hormônio, a qual juntamente com a fração ligada à albumina representa a testosterona biodisponível e constitui aproximadamente 40% do total de testosterona presente no organismo masculino [32]. Homens obesos podem sofrer com a diminuição nos níveis de testosterona, um problema chamado de *Hipogonadismo*, que é definido como falha dos testículos em produzir níveis fisiológicos adequados de testosterona [63] e deficiência no processo de gametogênese [9].

Outro fator que pode afetar os níveis de testosterona em homens obesos é a conversão de testosterona em estradiol através da enzima citocromo P450 da aromatase, expressa em altos níveis em tecido adiposo e que desempenha papel crucial na síntese de estrógenos [53,69]. O estrogênio, uma vez em níveis elevados, causa efeito de feedback negativo sobre o eixo HPG em dois locais: sobre o hipotálamo, diminuindo a frequência dos pulsos de GnRH; e na pituitária diminuindo a secreção de LH que, por sua vez diminuído, tem menor ação sobre as células de Leydig que por fim, sintetizarão menos testosterona [31]. O hiperestrogenismo que, na maioria das vezes resulta na queda dos níveis de testosterona é um fator preocupante no cenário da obesidade masculina, pois este estado

hipogonadotrófico, além de afetar a espermatogênese e funções sexuais, parece também relacionar-se com desordens cardíacas [63].

Além dos já citados, outro hormônio que faz parte deste cenário e que tem sido pouco estudado é a PRL. Sua relação é pouco descrita na literatura e altos níveis séricos de PRL parecem fazer parte das bases complexas da disfunção sexual (DE) em obesos mórbidos cuja normalização tem acompanhado a melhoria da DE, juntamente com a perda de peso [66]. A hiperprolactinemia parece ter um efeito negativo apenas em altos níveis, causando perda da libido, impotência sexual e ginecomastia, sendo alta a incidência destes problemas na obesidade. A PRL assim como o E2 tem efeitos sobre a expressão de GnRH e inibe a secreção de gonadotrofinas, reduz a conversão de andrógenos para testosterona e ainda tem efeito depressor no sistema nervoso central por diminuir a ação dopaminérgica [56].

A obesidade também afeta de maneira significativa os parâmetros seminais e funcionais dos espermatozoides. Pacientes obesos apresentam diminuição na concentração de espermatozoides, menor motilidade, maior fragmentação de DNA espermático, menor atividade mitocondrial e maiores níveis de peroxidação lipídica [24,35,43].

Com relação ao perfil hormonal, o tecido adiposo branco é o maior órgão endócrino/secretor em nosso organismo, nele encontramos enzimas que realizam a conversão de andrógenos em estrógenos o que acarreta diversas disfunções no organismo. Uma dessas disfunções é o hiperestrogenismo já citado anteriormente [8,60]. Outra disfunção está ligada à secreção de hormônios denominados “adipócitos” e seus produtos denominados “adipocinas”, que atuam como imunomoduladores. Os adipócitos atuam de maneira imperativa na homeostase do organismo através da regulação de ingestão de comida, balanço energético, ação insulínica, coagulação, entre outros. Em obesos, há elevação de adipócitos circulantes, o que pode afetar as funções reprodutivas [14]. Níveis elevados do adipócito leptina parecem estar relacionados a baixos níveis de testosterona, indicando possível influência inibitória através da interação desta com receptores de leptina expressos nas células de Leydig, além de atuar diretamente sobre os espermátócitos que possuem receptores de leptina em sua membrana plasmática, causando disfunção da espermatogênese quando em níveis elevados [38].

Com relação aos parâmetros seminais e funcionais, a obesidade pode interferir promovendo um estado de estresse oxidativo por conta do acúmulo de gordura na

região pubiana e interna da coxa, o que provoca estresse térmico testicular. O estresse oxidativo é o resultado da elevada produção de espécies reativas de oxigênio (EROS) ou da incapacidade de produzir compostos antioxidantes suficientes para neutralizá-las [4]. As EROS são radicais livres provenientes da metabolização do oxigênio, pois possuem um ou mais elétrons não pareados em sua órbita externa, o que lhes possibilita reagir com diferentes compostos presentes no organismo, sendo benéficas a níveis fisiológicos no entanto, quando em excesso, podem atacar alvos celulares que no testículo, seriam os espermatozoides [18,78].

Em baixas concentrações, as EROS têm papel importante na mediação de processos fisiológicos dos espermatozoides tais como a capacitação, a hiperativação, a reação acrossômica e a ligação dos espermatozoides à zona pelúcida do oócito [11,18] mas em excesso, possuem efeitos negativos nestas e em outras funções, como na atividade mitocondrial, na liberação de enzimas celulares, levando a danos nas membranas celulares e à morte celular [82]. Ácidos graxos presentes nas membranas plasmáticas e mitocondriais tornam os espermatozoides sensíveis aos danos induzidos por EROS, desencadeando uma série de reações químicas conhecidas como peroxidação lipídica, a qual induz a danos nas membranas celulares e mudanças em sua natureza [24,80].

A produção de EROS ocorre em cadeia sendo que, para cada etapa existem compostos antioxidantes específicos, podendo estes ser de origem enzimática [superóxido dismutase (SOD), catalase e a glutathione peroxidase (GPx)] e não enzimática (vitaminas C e D e glutathione) [27]. A espermatogênese é condicionada a uma temperatura ótima entre 34-35°C em humanos [6 7]; com o aumento da deposição de tecido adiposo nessas regiões, o estresse térmico aumenta a taxa metabólica e o consumo de oxigênio, o que sem o devido suporte antioxidante aumentado, leva a uma sobrecarga de EROS e, conseqüentemente, ao estabelecimento do estresse oxidativo [77].

Além do estresse térmico, o excesso de liberação de adipocinas pelo tecido adiposo promove um estado inflamatório no organismo que é tóxico ao espermatozoide, pois também aumenta a liberação de EROS em resposta à elevação das taxas metabólicas necessárias para restauração dos processos biológicos normais. O processo inflamatório somado ao estresse térmico testicular pode aumentar substancialmente os níveis de EROS nesse microambiente [19].

Artigos na literatura demonstram uma relação negativa entre obesidade e vários parâmetros espermáticos na população em geral [1,40,51]. Jensen et al. (2004) [40] constataram que, entre homens com sobrepeso, 24,4% apresentavam contagem total de espermatozoides menor que 20 milhões por mililitro, comparado a 21,7% entre homens com peso normal. Fariello et al. (2007) [23] encontraram dados semelhantes, e em 2012, Palmer e colaboradores [60] apresentaram em seu trabalho uma análise sumária sobre parâmetros espermáticos de 23 artigos, dos quais 15 relatavam diminuição na concentração espermática de pacientes obesos corroborando com Jensen et al. [40] e Fariello et al. (23). Em contraponto, alguns pesquisadores relataram não terem encontrado dados significativos sobre a diminuição da qualidade seminal em homens obesos [7,51,71,79].

Diante da evidência de tantas alterações causadas pela obesidade, várias pesquisas têm sido desenvolvidas a fim de descobrir se a perda de peso cirúrgica e/ou não cirúrgica é capaz de reverter tais alterações. No entanto, os resultados presentes na literatura são divergentes com relação à maioria dos parâmetros propostos neste estudo, o que atribui relevância a nossos achados.

A média de idade dos participantes deste estudo foi de 34,5 anos e todos foram submetidos à cirurgia bariátrica de BGYR tendo redução de aproximadamente 23% no IMC [43,7 para 33,5 kg/m² (p=0,000)] três meses após o procedimento. Dentre os parâmetros hormonais estudados, encontramos aumento nos níveis de testosterona total (p=0,025) e diminuição nos níveis de estradiol (p=0,001), corroborando com estudos recentes de Facchiano et al. (2013) [21] e Luconi et al. (2013) [49], entre outros [30,63,66,87]. Observamos valores de correlação estatisticamente significantes entre E2 e IMC ($R^2= 0,601$ e $p<0,000$), o que demonstra que alterações no IMC podem influenciar nos níveis de E2 circulantes. Não houve aumento estatisticamente significativo para testosterona livre corroborando com Luconi et al. (2013) [49] e Facchiano et al. (2013) [21], porém diversos autores encontraram resultados diferentes [30,63,65]. Uma possibilidade para tal diferença é o período pós cirurgia em que os hormônios foram dosados, Fachiano et al. (2013) [21] e Luconi et al. (2013) [49] fizeram análises 6 meses após a realização da cirurgia, com espaço de tempo mais próximo ao realizado neste estudo, que foi de 3 meses após a cirurgia, enquanto os demais autores utilizaram espaço de tempo maior, em média 1 ano, para realizar a primeira análise.

Acredita-se que os níveis de testosterona livre estão ligados diretamente aos níveis de LH circulantes assim como os níveis de testosterona total aparentemente estão positivamente relacionados aos níveis de globulina ligadora de hormônios sexuais (SHBG), produzida pelo fígado e que parece estar negativamente relacionada aos níveis de insulina, que costumam estar aumentados na obesidade [48]. Embora não tenhamos realizado a dosagem de SHBG, estudos pregressos [21,49] mostraram que a perda de peso por si proporciona aumento na síntese de SHBG e nos níveis de TT. Também pudemos observar a diminuição nos níveis de estradiol, o que sugere que a perda de peso é benéfica com relação à diminuição da conversão de andrógenos para estrógenos.

Quanto aos níveis de TL, observamos aumento na média, mas sem relevância estatística, assim como nos níveis de LH, o que possibilita analisar a relação positiva entre os dois hormônios. Embora haja dúvidas quanto à diminuição nos níveis de gonadotrofinas em obesos, Cabler et al. (2010) [14] relataram em sua revisão que homens obesos apresentaram menores níveis circulantes e diminuição nos pulsos de LH. Vermeulen et al. (1993) [84] apresentaram em seus trabalhos dados que sugerem que os níveis de TL estão relacionados aos níveis séricos e amplitude média dos pulsos de LH, e a atenuação dos pulsos epifisários de LH parece afetar a produção de TL pelas gônadas, o que sugere uma ação hipogonadotrófica central, levando a diminuição dos níveis de séricos de TL em homens obesos [48]. Logo é possível que com o aumento na média nos níveis de LH, possamos observar aumento também nos níveis de TL. No entanto, ainda é parcialmente desconhecido os mecanismos que controlam os níveis de TL, sendo necessário estudos futuros que abordem de maneira pontual este tema [48].

Outros parâmetros que causam divergência entre autores são os níveis circulantes de gonadotrofinas e prolactina (PRL) [30,63,66,68]. Em nosso estudo não encontramos diferenças estatísticas em relação ao FSH e PRL, corroborando com Reis et al. (2012) [65] e Rosenblatt et al. (2012) [68]. Em relação ao LH encontramos aumento médio de 1 mUI/mL no período analisado, porém sem valor estatístico significativo, entretanto observamos uma tendência estatística ($p=0,055$). Após seis meses da realização do procedimento cirúrgico Facchiano et al. (2013) [21] e Luconi et al. (2013) [49] encontraram valores de $p=0,048$ e $p=0,010$ respectivamente, o que sugere que o processo de estabilização da secreção de LH necessita de um espaço de tempo maior que o avaliado em nosso estudo.

Na literatura, no que se refere a parâmetros seminais e cirurgia bariátrica, poucos dados estão disponíveis. Três relatos de caso foram publicados até o presente momento. O primeiro [20] relatou o caso de seis homens com fertilidade comprovada previamente “a cirurgia”, depois do procedimento citado todos os pacientes foram caracterizados com azoospermia não obstrutiva e parada completa da espermatogênese diagnosticada por biópsia testicular. O segundo [75] relatou o caso de três pacientes que apresentaram piora importante nos parâmetros seminais sem associação com alteração hormonal. E por fim, Lazaro et al. (2012) [47] relataram o caso de dois pacientes que se submeteram a procedimentos de reprodução assistida antes e após a cirurgia e que apresentaram queda dos parâmetros seminais, sendo que um foi caracterizado como azoospérmico após a cirurgia. O perfil hormonal de todos os pacientes nos três estudos (exceto de um participante do estudo de Sermondade et al. (2012) [75] que não realizou dosagem) era normal no momento da análise pós-cirúrgica. Os autores [20,47,75] sugerem que o bloqueio na espermatogênese ocorreu em algum ponto não relacionado ao envolvimento dos hormônios sexuais com os testículos, e levantaram a hipótese de que a queda de absorção de nutrientes depois da cirurgia possa explicar os eventos observados.

Apenas Reis et al. (2012) [65] avaliaram prospectivamente os parâmetros seminais relacionados à cirurgia bariátrica. O estudo prospectivo randomizado contou com a participação de 20 homens obesos que foram alocados em grupos de 10. Ambos os grupos foram submetidos a um programa de modificação de hábitos alimentares e exercícios físicos por 4 meses, após o qual o grupo de intervenção foi submetido à cirurgia de BGYR e o grupo controle foi orientado a manter as modificações de hábitos, mas nenhum programa foi oficialmente oferecido. Análises hormonais e seminais foram realizadas no início do estudo, após 4 meses de intervenção dietética e 24 meses após a realização da cirurgia. Como resultado, eles encontraram aumento nos níveis de TT, TL e FSH, redução de PRL e manutenção de E2 nas análises inter e intra-grupos. Quanto aos parâmetros seminais, foram realizados espermogramas segundo os critérios da OMS (1999) [90], sem o encontro de alterações com relevância estatística em nenhum dos períodos analisados.

Em nosso estudo, a maioria dos parâmetros seminais analisados não apresentaram resultados com relevância estatística, corroborando parcialmente com

os resultados de Reis et al. (2012) [65]. No entanto, nossos resultados divergiram quanto à presença de células redondas no ejaculado, pois observamos diminuição de aproximadamente 60% no período analisado [4,7 para 1,7- média ($p=0,025$)]. Os testes de correlação entre IMC e células redondas demonstraram que o IMC pode influenciar na liberação de células redondas ($R^2=0,197$ e $p=0,30$), indicando que a perda de peso pode beneficiar a espermatogênese com a diminuição da descamação do epitélio germinativo.

O sêmen humano consiste em diferentes tipos de células tais como espermatozoides maduros, células redondas que correspondem a células de diferentes estados do processo de espermatogênese, leucócitos e células epiteliais. Destes, os leucócitos (neutrófilos e macrófagos) e os espermatozoides imaturos são as duas principais fontes de EROS [5]. Durante a espermatogênese, o citoplasma é geralmente expelido do espermatozoide antes da liberação do epitélio. Assim, a estrutura celular dos espermatozoides, rica em ácidos graxos, torna-os particularmente sensíveis ao estresse oxidativo [42].

Em altas concentrações de EROS os espermatozoides não são capazes de reparar os danos, pois lhes falta o sistema enzimático citoplasmático necessário para tal [6]. No entanto, a perda de peso após a cirurgia mostrou ser eficaz na diminuição do estresse térmico que, por sua vez, levou à diminuição da presença de células redondas no ejaculado, embora o teste de peroxidação lipídica não tenha apresentado valor estatístico significativo. A diminuição da liberação de células redondas sugere diminuição da descamação do epitélio germinativo, um possível reflexo da diminuição dos danos oxidativos sobre o epitélio, e talvez em longo prazo, efeitos positivos possam ser observados sobre a morfologia espermática, tendo em vista que, com a diminuição das EROS, há menor agressão às estruturas do espermatozoide, possibilitando sua maturação adequada., até mesmo diminuindo os níveis de fragmentação de DNA espermático e aumentando a atividade mitocondrial do espermatozoide.

Observamos também tendências estatísticas no que se refere ao aumento na contagem total de espermatozoide [86,9 para 123,5 $\times 10^6$ – média ($p=0,056$)] e aumento na contagem total de espermatozoides móveis [53,9 para 79,4 $\times 10^6$ – média ($p=0,062$)]. Os resultados encontrados em divergência com os de Reis et al. (2012) [65], estão de acordo com Hakonsen et al. (2011) [29] que avaliaram o impacto da perda de peso não cirúrgica sobre a qualidade seminal e hormônios

reprodutivos de pacientes obesos, e observaram aumento na contagem total de espermatozoides ($p=0,02$). Embora o estudo não avalie a perda de peso sob foco cirúrgico como nosso trabalho, devido à escassez de dados disponíveis na literatura para discussão, os dados encontrados por Hakonsen et al. (2011) [29] são um possível parâmetro de comparação.

Não foram encontrados estudos avaliando o impacto da perda de peso através da cirurgia de BGYR sobre parâmetros funcionais de fragmentação de DNA espermático, atividade mitocondrial de espermatozoides e peroxidação lipídica. Em nosso estudo avaliamos tais parâmetros, porém não houve resultados estatisticamente significantes, Hakonsen et al. (2011) [29] avaliaram a integridade de DNA espermático e também não encontraram valores estatísticos significantes. Vale ressaltar que embora Hakosen et al. (2011) [29] tenha avaliado a perda de peso por foco diferente de nosso, este estudo é o que mais se aproxima com relação a tamanho de amostra experimental e tempo de análise (pré e 103 dias em média) tendo em vista que foram analisados 10 pacientes com perda substancial de peso (± 22 kg) após o início do programa.

Em nosso estudo, há limitações que devem ser destacadas. Nossa população de estudo é pequena devido à grande dificuldade no recrutamento de pacientes, haja vista que aproximadamente 80% das cirurgias bariátricas realizadas em nosso país são realizadas por mulheres [73]. Outra limitação importante é o curto espaço de tempo avaliado. No entanto, este período compreende um ciclo completo de espermatogênese e nos possibilitou avaliar mudanças significativas já no primeiro trimestre após a realização da cirurgia. Tais dificuldades são freqüentes entre os estudos presentes na literatura sobre o assunto abordado e futuros estudos com coortes maiores e períodos de acompanhamento longos são necessários para confirmar estes resultados preliminares.

Vários aspectos com relação ao impacto da obesidade sobre o organismo humano ainda intrigam pesquisadores do mundo inteiro e diversas perguntas até o presente momento permanecem sem resposta. Assim como a obesidade, muitos aspectos com relação à Reprodução Humana precisam ser investigados para que se possa compreender como efetivamente se dá esse magnífico processo da natureza e o que pode afetá-lo de forma positiva ou negativa. Com base nisto, há muito que se investigar a respeito da relação obesidade versus fertilidade masculina, e muito mais a respeito da relação obesidade versus cirurgia bariátrica versus fertilidade

masculina, e estudos prospectivos com seguimento em longo prazo se fazem necessários para elucidar tais questões.

5 CONCLUSÃO

Nas condições deste estudo podemos concluir que a perda de peso através da cirurgia bariátrica de BGYR em pacientes obesos:

1. Afeta de maneira positiva o perfil hormonal reprodutivo masculino.
2. Não afeta os parâmetros seminais.
3. Não afeta os níveis peroxidação lipídica.
4. Não altera os aspectos funcionais de fragmentação do DNA espermático e atividade mitocondrial espermática em relação aos padrões apresentados previamente à cirurgia.

6 ANEXO

Anexo 1. Protocolo referente método de coloração por 3,3'-diaminobenzidina (DAB) para avaliação de atividade mitocondrial espermática, proposto por Hrudka (1987) [36].

Diluição:

$$\frac{\text{Amostra}}{\text{Corante DAB}} = \frac{30 \mu\text{l}}{90 \mu\text{l}}$$

Ajustar o volume de corante DAB de acordo com a concentração de espermatozoides no sêmen.

Passo 1: Em um tubo colocar os 30 μl de amostra juntamente com 90 μl de corante DAB.

Passo 2: Colocar o tubo com a solução em banho-maria aquecido a 37°C por 1 hora.

Passo 3: Retirar a solução do banho-maria e em seguida preparar dois esfregaços em lâminas com 20 μl de solução em cada.

Passo 4: Deixar secar em temperatura ambiente.

Passo 5: Fixar em formaldeído 10% por 10 minutos, e em seguida retirar e deixar secar em temperatura ambiente.

Passo 6: Ler 200 células ao microscópio.

Anexo 2. Protocolo referente ao teste de Dispersão da Cromatina Espermática (SCD) para avaliar a integridade do DNA nuclear do espermatozoide proposto por Fernández et al. (2003) [25].

Passo 1: Pipetar em um tubo 250 µl de Agarose Low Melting a 37°C, e quantidade de volume seminal ajustado para concentração entre 5 e 10 milhões de espermatozoides.

Passo 2: Cobrir a lâmina com 1000 µl de solução de desnaturação (0,08 NHCl) por 7 minutos a 22°C em ambiente escuro.

Passo 3: Pipetar em lâmina previamente preparada revestida de 100 µl de Agarose Normal Melting, 50 µl da solução preparada no passo 1. Cobrir com lamínula 24x60 mm e manter a 4°C por 4 minutos.

Passo 4: Retirar a lamínula e cobrir com 1000 µl de solução de neutralização e lise 1 (0,4M Tris; 0,8M DTT; 1% SDS; 50mM EDTA; pH 7,5) por 10 minutos a temperatura ambiente.

Passo 5: Cobrir a lâmina com 1000 µl de solução de neutralização e lise 2 (0,4M Tris; 0,8M DTT; 1% SDS; pH 7,5) por 5 minutos a temperatura ambiente.

Passo 6: Lavar a lâmina com TBE (0,09M TRIS; 0,07M Borato; 0,002M EDTA; pH 7,5) por 2 minutos.

Passo 7: Desidratar a lâmina com etanol 70%, 90% e 100% por dois minutos cada.

Passo 8: Corar com corantes panótico ou Diff Quik segundo o indicado por cada corante.

Passo 9: Ler ao 200 células ao microscópio.

Anexo 3. Protocolo referente à técnica de TBARS para dosagem dos níveis de peroxidação lipídica causado pela ação das espécies reativas de oxigênio (ROS) de acordo com um protocolo descrito por Ohkawa et al. (1979) [59].

Passo 1: Centrifugar a amostra de sêmen a 16.100 giros por 15 minutos.

Passo 2: Pipetar uma alíquota de 500 µl do sobrenadante em um tubo.

Passo 3: Pipetar 500 µl da amostra mais 1000 µl de solução 10% (v:v) de ácido tricloroacético (TCA 10%), centrifugar a 16.100 giros a 15°C por 15 minutos.

Passo 4: Pipetar 500 µl do sobrenadante e adicionar 500 µl de ácido tiobarbitúrico 1% (TBA 1%), em 0.05N de hidróxido de sódio, levar a banho-maria (100°C) por dez minutos.

Passo 5: Retirar do banho-maria e levar ao gelo para cessar reação química.

Passo 6: Quantificar em espectrofotômetro em um comprimento de onda de 532nm.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABDEL-HALIM RE. Obesity: 1000 years ago. *Lancet*; 366 (9481):204. 2005.
2. ABREU LG, SANTANA LF, NAVARRO PS, REIS RM, FERRIANI RA, MOURA MD. The pregnancy rate in women submitted to assisted reproduction techniques is lower after the age of 30 years. **Rev Bras Ginecol Obstet.** 7: 28-32, 2006.
3. ADAMS T.D, GRESS R.E, SMITH S.C, HALVERSON R.C, SIMPER S.C, ROSAMOND W.D, LAMONTE M.J, STROUP A.M AND HUNT S.C. Long-term mortality after gastric bypass surgery. **New England Journal of Medicine** 357, 753-761. 2007.
4. AGARWAL A, SALEH RA. Role of oxidants in male infertility: rationale, significance, and treatment. **Urol Clin North Am.** 29(4):817-827. 2002.
5. AGARWAL, A., MAKKER, K. AND SHARMA, R. Clinical relevance of oxidative stress in male factor infertility: an update. **Am J Reprod Immunol.** 59, 2-11. 2008a.
6. AGARWAL, A., COCUZZA, M., RAZIKA., H. AND SHARMA, R. Oxidative stress measurement in patients with male or female factor infertility. **Handbook of Chemiluminescent Methods in Oxidative Stress Assessment.** 195-218. 2008b.
7. AGGERHOLM AS, THULSTRUP AM, TOFT G, RAMLAU-HANSEN CH AND BONDE JP. Is overweight a risk factor for reduced semen quality and altered serum sex hormone profile? **Fertil Steril** 90, 619-626). 2008.
8. AKINGBEMI BT. Estrogen regulation of testicular function. **Reprod Biol Endocrinol.** 3:51. 2005.
9. BANDEIRA F AND ALEIXO A. **Endocrinologia e Diabetes**, 2ª Edição, MEDBOOK, (2009).
10. BELLVER J, PELLICER A. Impact of obesity on spontaneous abortion. **Am J Obstet Gynecol.** 190: 293–294, 2004.
11. BERTOLLA RP, FRAIETTA R. Estresse oxidativo e infertilidade masculina. **SHBR.** 4: 5-6, 2007.
12. BRANT WO, MYERS JB, CARRELL DT, SMITH JF. Male athletic activities and their effects on semen and hormonal parameters. **Phys Sportsmed**, 38 (3), 114-120. 2010.
13. BUCHWALD H, WILLIAMS SE. Bariatric surgery worldwide 2003. **Obes Surg.** 14(9):1157-1164, 2004.
14. CABLER S, AGARWAL A, FLINT M, ET AL. Obesity: modern man's fertility nemesis. **Asian J Androl.** 12(4):480–9. 2010.
15. CHAVARRO JE, RICH-EDWARDS JW, ROSNER BA, WILLETT WC. Diet and lifestyle in the prevention of ovulatory disorder infertility. **Obstet Gynecol.** 110:1050–8, 2007.
16. Consensus Development Conference Panel, NIH Conference. Gastrointestinal surgery for severe obesity. **Ann Intern Med.** 115(12):956-961. 1991.

17. de KRETZER, D.M., BUZZARD, J.J., OKUMA, Y., O'CONNOR, A.E., HAYASHI, T., LIN, S.Y., MORRISON, J.R., LOVELAND, K.L., HEDGER, M.P. The role of activin, follistatin and inhibin in testicular physiology. *Mol. Cell. Endocrinol.* 225, 57–64. 2004.
18. de LAMIRANDE E, JIANG H, ZINI A, KODAMA H, GAGNON C. Reactive oxygen species and sperm physiology. **Rev Reprod.** 2(1):48-54. 1997.
19. DAVI G, FALCO A. Oxidant stress, inflammation and atherogenesis. **Lupus.** 14: 760–4. 2005.
20. DI FREGA AS, DALE B, DI MATTEO L AND WILDING M. Secondary male factor infertility after Roux-en-Y gastric bypass for morbid obesity: Case report **Human Reproduction** Vol.20, No.4 pp. 997–998, 2005.
21. FACCHIANO E, SCARINGI S, VELTRI M, SAMAVAT J, MAGGI M, FORTI G, LUCONI M, LUCCHESI M. Age as a predictive factor of testosterone improvement in male patients after Bariatric Surgery: Preliminary Results of a Monocentric Prospective Study. **Obes Surg.** 23, 167-172. 2013.
22. FARIELLO RM AND SPAINE DM. Efeito da obesidade na fertilidade. **SHBR.** 4: 7-8, 2007.
23. FARIELLO RM, DEL GIUDICE PT, DA SILVA BF, SPAINE DM, BERTOLLA RP, CEDENHO AP. Effect of obesity on semen quality – an update. **Fertil Steril.** 88(suppl1):S390-1, 2007.
24. FARIELLO RM, PARIZ JR, SPAINE DM, CEDENHO AP, BERTOLLA RP AND FRAIETTA R. Association between obesity and alteration of sperm DNA integrity and mitochondrial activity. **BJU Int.** 110: 863-867. 2012.
25. FERNÁNDEZ JL, MURIEL L, RIVERO MT, GOYANES V, VAZQUEZ, ALVAREZ JG. The sperm chromatin test: a simple method for the determination of sperm DNA fragmentation. **J Androl.** 24: 59-67. 2003.
26. FLANAGAN JM, POPENDIKYTE V, POZDNIAKOVAITE N, SOBOLEV M, ASSADZADEH A, SCHUMACHER A, ET AL. Intra- and interindividual epigenetic variation in human germ cells. **Am J Hum Genet.** 79:67–84, 2006.
27. GARRIDO N, MESEGUER M, SIMON C, PELLICER A, REMOHI J. Pro-oxidative and anti-oxidative imbalance in human semen and its relation with male fertility. **Asian J Androl.** 6:59-65, 2004.
28. GRIFFIN, J.E., WILSON, J.D. Disorders of the testes and the male reproductive tract. In: Reed Larsen, P., Kronenberg, H.M., Melmed, S., Polonsky, K.S. (Eds.), **Williams Textbook of Endocrinology**, 10th ed. Saunders. 2003
29. HAKONSEN LB, THULSTRUP AM, AGGERHOLM AS, ET AL. Does weight loss improve semen quality and reproductive hormones? Results from a cohort of severely obese men. **Reprod Health.** 8:24. 2011.
30. HAMMOUD A, GIBSON M, HUNT SC, ADAMS TD, CARRELL DT, KOLOTKIN RL, AND MEIKLE AW. Effect of Roux-en-Y Gastric Bypass Surgery on the Sex Steroids and Quality of Life in Obese Men. **J Clin Endocrinol Metab** 94: 1329–1332, 2009.

31. HAYES, F.J., SEMINARA, S.B., DECRUZ, S., BOEPPLE, P.A., CROWLEY JR., W.F., 2000. Aromatase inhibition in the human male reveals a hypothalamic site of estrogen feedback. **J. Clin. Endocrinol. Metab.** 85, 3027–3035. 2000.
32. HEFFNER LJ, SCHUST DJ. The pituitary gland. In: **The Reproductive System at a Glance**. 3rd ed.
33. Chichester, West Sussex, UK; Hoboken, NJ: Wiley-Blackwell; 2010.
34. HINZ S., RAIS-BAHRAMI S., KEMPKENSTEFFEN C., WEISKE WH., MILLER K., MAGHELI A. Effect of obesity on sex hormone levels, antisperm antibodies, and fertility after vasectomy reversal. **Urology** 76 (4) 851-856. 2010.
35. HOFNY ER, ALI ME, ABDEL-HAFEZ HZ, EL-DIEN KAMAL E, MOHAMED EE, ABD EL-AZEEM HG, ET AL. Semen parameters and hormonal profile in obese fertile and infertile males. **Fertil Steril.** 94:581-4. 2010.
36. HRUDKA, F. Cytochemical and ultracytochemical demonstration of cytochrome c oxidase in spermatozoa and dynamics of its changes accompanying ageing or induced by stress. **Int. J. Androl.** 10: 809-828, 1987.
37. HUXLEY R, MENDIS S, ZHELEZNYAKOV E, REDDY S, CHAN J. Body mass index, waist circumference and waist:Hip ratio as predictors of cardiovascular risk—a review of the literature. **Eur J Clin Nutr.** 64: 16–22. 2010.
38. ISHIKAWA T, FUJIOKA H, ISHIMURA T, TAKENAKA A, FUJISAWA M. Expression of leptin and leptin receptor in the testis of fertile and infertile patients. **Andrologia.** 39:22–27. 2007.
39. JANE E NORMAN. The adverse effects of obesity on reproduction. **Reproduction.** 140; 343-345. 2010.
40. JENSEN TK, ANDERSSON AM, JORGENSEN N, ANDERSEN AG, CARLSEN E, PETERSEN JH, ET AL. Body mass index in relation to semen quality and reproductive hormones among 1,558 Danish men. **Fertil Steril.** 82: 863–70, 2004.
41. IVELL R. Lifestyle impact and the biology of the human scrotum. **Reprod Biol Endocrinol.** 5:15. 2007.
42. KEFER, J., AGARWAL, A. AND SABANEKH, E. Role of antioxidants in the treatment of male infertility. **International Journal of Urology.** 16, 449-457. 2009.
43. KORT HI, MASSEY JB, ELSNERCW, MITCHELL-LEEF D, SHAPIRO DB, WITT MA, ET AL. Impact of body mass index values on sperm quantity and quality. **J Androl** 27: 450–2, 2006.
44. KREMEN AJ, LINNEN JH AND NELSON CH. An experimental evaluation of the nutritional importance of proximal and distal small intestine. **Ann Surg** 140: 439–448, 1954.
45. KRUGER, T.F., MENKVELD, R., STANDER, F.S., LOMBARD, C.J., VAN DER MERWE, J.P., VAN ZYL, J.A. AND SMITH, K. Sperm morphologic features as a prognostic factor in vitro fertilization. **Fertil. Steril.** 46: 1118-1123, 1986.

46. DE LAMIRANDE E, GAGNON C: Reactive oxygen species and human spermatozoa. Depletion of adenosine triphosphate plays an important role in the inhibition of sperm motility. **J Androl**, 13:379–86; 1992
47. LAZARO L, HATZI E, MARKOULA S, TAKENAKA A, SOFIKITIS N, ZIKOPOULOS K, GIORGIOU I. Dramatic reduction in sperm parameters following bariatric surgery: report of two cases. **Andrologia**. 44:428-432. 2012.
48. LIMA N, CAVALIERE H, HALPERN A, MEDEIROS-NETO G. A função gonadal do homem obeso. **Arq Bras Endocrinol Metab**. 44: 31-37. 2000.
49. LUCONI M, SAMAVAT J, SEGUIERI G, IANUZZI G, LUCCHESI M, ROTELLA C, FORTI G, MAGGI M, MANNUCCI E. Determinants of testosterone recovery after bariatric surgery: Is it only a matter of reduction of body mass index? **Fertil Steril**. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fertnstert.2013.02.039> . 2013.
50. MACDONALD AA, HERBISON GP, SHOWELL M & FARQUHAR CM. The impact of body mass index on semen parameters and reproductive hormones in human males: a systematic review with meta-analysis. **Human Reproduction Update**. 16 293–311. 2010.
51. MAGNUSDOTTIR EV, THORSTEINSSON T, THORSTEINSDOTTIR S, HEIMISDOTTIR M, OLAFSDOTTIR K. Persistent organochlorines, sedentary occupation, obesity and human male subfertility. **Hum Reprod**. 20:208–15, 2005.
52. MAH PM AND WITTERT G.A. Obesity and testicular function. **Mol and Cel Endocrinol**. 316: 180–186. 2010
53. MEINHARDT U, MULLIS PE. The essential role of the aromatase p450 citocrom. **Semin Reprod Med**. 20:277-84. 2002.
54. METWALLY M, ONG KJ, LEDGER WL, LI TC. Does high body mass index increase the risk of miscarriage after spontaneous and assisted conception? A meta-analysis of the evidence. **Fertil Steril**. Dec 6 [Epubahead of print], 2007.
55. MOURA EC AND CLARO RM. Estimates of obesity trends in Brazil, 2006-2009. **Int J Public Health**. 57 (1) 127-133. 2012
56. MORALES, A., BUVAT, J., GOOREN, L. J. ET AL. Endocrine aspects of sexual dysfunction in men. **Journal of Sexual Medicine**. 1, 69–81. 2004.
57. MULLER M, DEN TONKELAAR I, THIJSSSEN JHH, GROBBEE DE, VAN DER SCHOUW YT. Endogenous sex hormones in men aged 40–80 years. **Eur J Endocrinol**. 149:583–589. 2003.
58. OGDEN CL, CARROLL MD, CURTIN LR, MCDOWELL MA, TABAK CJ, FLEGAL KM. Prevalence of overweight and obesity in the United States, 1999–2004. **JAMA**. 295: 1549–55, 2006.
59. OHKAWA, H., OHISHI, N. AND YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Anal. Biochem**. 95: 351-358, 1979.
60. PALMER NO, BAKOS HW, FULLSTON T AND LANE M. Impact of obesity on male fertility, sperm function and molecular composition. **Spermatogenesis**. 2:4, 253-263. 2012

61. PATE RR, PRATT M, BLAIR SN, ET AL. Physical activity and public health. A recommendation from the centers for disease control and prevention and the American College of Sports Medicine. **JAMA**. 273(5):402-407. 1995.
62. PAYNE JH, DEWIND LT AND COMMONS RR. Metabolic observations in patients with jejunocolic shunts. **Am J Surg**. 106: 273, 1963.
63. PELLITERO S, OLAIZOLA I, ALASTRUE A, MARTINEZ E, GRANADA ML, BALIBREA JM, MORENO P, SERRA A, NAVARRO-DIAS M, ROMERO R, PUIG-DOMINGO M. Hypogonadotropic hypogonadism in morbidly obese males is reversed after bariatric surgery. **Obes surg**. 22: 1835-1842. 2012
64. RAO SR, KINI S, TAMLER R. Sex hormones and bariatric surgery in men. **Gend Med**. 8(5):300–11. 2011.
65. REIS LM AND DIAS FGF. Male fertility, obesity, and bariatric surgery. **Reproduction Science**. 19: 778-785. 2012.
66. REIS LO, FAVARO WJ, BARREIRO GC, ET AL. Erectile dysfunction and hormonal imbalance in morbidly obese male is reversed after gastric bypass surgery: a prospective randomized controlled trial. **Int J Androl**. 33(5):736-744. 2010.
67. ROBINSON D, ROCK J, MENKIN MF. Control of human spermatogenesis by induced changes of intrascrotal temperature. **JAMA**. 204:290- 7. 1968.
68. ROSENBLATT A, FAINTUCH J, CECCONELLO I. Sexual hormones and erectile function more than after 6 years after bariatric surgery. **Surg for Obes and related diseases**. <http://dx.doi.org/10.1016/j.soard.2012.06.010>. 2012.
69. ROTH MY, AMORY JK, PAGE ST. Treatment of male infertility secondary to morbid obesity. **Nat Clin Pract Endocrinol Metab**. 4: 415–9. 2008.
70. RUBINO F, SHUKLA A, POMP A, MOREIRA M, SOO MIN AHN AND DAKIN G. Bariatric, Metabolic and Diabetes Surgery. **Ann Surg**. 00; 1-6. 2012.
71. RYBAR R, KOPECKA V, PRINOSILOVA P, MARKOVA P, RUBES J. Male obesity and age in relationship to semen parameters and sperm chromatin integrity. **Andrologia**. 43:286-91. 2011.
72. SANTOS, L. M., OLIVEIRA, I. V., PETERS, L. R. & CONDE, W. L. Trends in morbid obesity and in bariatric surgeries covered by the Brazilian Public Health System. **Obesity Surgery**. doi: 10.1007/s11695-008-9570-3. 2008.
73. SANTOS LM, OLIVEIRA IV, PETERS LR, CONDE WL. Trends in morbid obesity and in bariatric surgeries covered by the Brazilian public health system. **Obes Surg**. 20(7):943-948. 2010.
74. SANTRY HP, GILLEN DL, LAUDERDALE DS. Trends in bariatric surgical procedures. **JAMA**. 294: 1909 –17, 2005.
75. SERMONDADE N, MASSIN N, BOITRELLE F, PFEFFER J, EUSTACHE F, SIFER C, CZERNICHOW S, LEVY R. Sperm parameters and male fertility after bariatric surgery: three case series. **Reproductive BioMedicine Online**. 24, 206– 210. 2012.

76. SAYENKO VF, LAVRYKAS, STETSENKO OP. Report on Bariatric Surgery in the Ukraine. **Obesity Surgery**, 10, 54-57. 2000.
77. SETCHELL BP. The Parkes Lecture. Heat and the testis. **J Reprod Fertil**. 114(2):179-194. 1998.
78. SHARMA RK, AGARWAL A. Role of reactive oxygen species in male infertility. **Urology**. 48(6):835-850. 1996.
79. SHAYEB AG, HARRILD K, MATHERS E, BHATTACHARYA S. An exploration of the association between male body mass index and semen quality. **Reprod Biomed Online**. 23:717-23. 2011.
80. SHIRAISHI K, TAKIHARA H, MATSUYAMA H. Elevated scrotal temperature, but not varicocele grade, reflects testicular oxidative stress-mediated apoptosis. **World J Urol**. 2010.
81. TEERDS K.J, DE ROOIJ D.G, AND KEIJER J. Functional relationship between obesity and male reproduction: from humans to animal models. **Human Reproduction Update**. 17: 667-683. 2011
82. TREMELLEN K. Oxidative stress and male infertility – a clinical perspective. **Hum Reprod Update**. 14(3):243-258. 2008.
83. VAN ROOIJ IA, BANCSI LF, BROEKMANS FJ, LOOMAN CW, HABBEMA JD, TE VELDE ER. Women older than 40 years of age and those with elevated follicle-stimulating hormone levels differ in poor response rate and embryo quality in vitro fertilization. **Fert Steril**. 79 (3): 482-8, 2003.
84. VERMEULEN A, KAUFMAN JM, DESLIJPERE JP, THOMAS G. Attenuated luteinizing hormone (LH) pulse amplitude but normal LH pulse frequency, and its relation to plasma androgens in hypogonadism of obese men. **J Clin Endocrinol Metab**. 76: 1140-6. 1993.
85. WASS P, WALDENSTROM U, ROSSNER S, HELLBERG D. An android body fat distribution in females impairs the pregnancy rate of in-vitro fertilization-embryo transfer. **Hum Reprod**. 12: 2057–2060, 1997.
86. WHO CONSULTATION ON OBESITY (1999: Geneva). Obesity: preventing and managing the global epidemic: report of a WHO consultation. Geneva: **World Health Organization**, 2000.
87. WOODARD G, AHMED S, PODELSKI V, HERNANDEZ-BOUSSARD T., J. PRESTI JR AND J. M. MORTON. Effect of Roux-en-Y gastric bypass on testosterone and prostate-specific antigen. **British Journal of Surgery**. 99, 693-698. 2012.
88. WORLD HEALTH ORGANIZATION: Recent Advances in Medically Assisted Conception. **WHO Technical Report**. 820, 1992.
89. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Laboratory manual for the examination and processing of human semen. **WHO**. Press 5th ed., 2010.
90. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction. **WHO**. New York: Cambridge University. Press 4th ed., 1999.

91. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Obesity and overweight; 2006. Retrieved from [www.who/int/en](http://www.who.int/en).
92. WU FCW, TAJAR A, PYE SR, SILMAN AJ, FINN JD, O'NEILL TW, ET AL. Hypothalamic–pituitary–testicular axis disruptions in older men are differentially linked to age and modifiable risk factors: the European male aging study. **J Clin Endocrinol Metab** 93:2737–45. 2008.
93. ZAHER O. AND MERHI, M.D. Bariatric surgery and subsequent sexual function. **Fertil Steril**. 87:711–2, 2007.

Abstract

Objectives: To evaluate changes in hormonal, seminal and sperm functional profile of obese men who underwent bariatric gastric bypass roux-Y surgery (RYGB). **Methods:** Prospective study of 12 obese men followed by 3 months after the procedure. Patients underwent measurement of total and free testosterone (TT and FT), estradiol (E2), prolactin (PRL), luteinizing and follicle stimulating hormones (LH and FSH). The semen samples were obtained and analyzed according to the criteria of the World Health Organization (2010) and morphology according to strict criteria of Kruger (1986). The integrity of the sperm nuclear DNA was evaluated by testing the sperm chromatin dispersion (SCD). Cells were classified according to morphology of the DNA observed: a) large halo (high integrity), b) medium halo (intact or fragmented top) c) small halo (moderate to highly fragmented) and D) absent halo (highly fragmented). The mitochondrial activity was assessed by a colorimetric method, where cells were classified into Class I (100% active mitochondria), class II (over 50% active mitochondria), class III (less than 50% active mitochondria) and class IV (100% of mitochondria inactive). The level of lipid peroxidation was determined using a method based on the reaction of MDA with TBA. **Results:** We observed increased levels of TT and decreased levels of E2. There were no changes in FT, FSH and PRL. In semen parameters decrease in the number of round cells was observed. There were no changes in the levels of lipid peroxidation, DNA integrity and mitochondrial activity. Statistical trends were observed as an increase in the levels of LH, total count and total motile sperm count. **Conclusions:** Weight loss via RYGB has a positive impact on the reproductive hormone profile, but no statistical evidence of changes in semen parameters and functional profile.

Keywords: Male Infertility, Obesity, Bariatric Surgery, Gastric Bypass, Hormonal profile; function tests;

Bibliografia Consultada

RENAN HIAGON. **Guia para elaboração de Teses 2ª ed.** /-- São Paulo: Biblioteca do Departamento de Diagnóstico por Imagem da UNIFESP, 2012.