



UFG

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

TATIANA MOREIRA DA SILVA

**EFEITO DO ÁCIDO FÓLICO NOS PRINCIPAIS
PARÂMETROS DO ESPERMOGRAMA DE HOMENS
SUBFÉRTEIS**

**Goiânia
2012**

TATIANA MOREIRA DA SILVA

**EFEITO DO ÁCIDO FÓLICO NOS PRINCIPAIS
PARÂMETROS DO ESPERMOGRAMA DE HOMENS
SUBFÉRTEIS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Goiás para obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Mario Silva Approbato

**Goiânia
2012**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
GPT/BC/UFG**

S586e Silva, Tatiana Moreira da.
Efeito do ácido fólico nos principais parâmetros do espermograma de homens subférteis [manuscrito] / Tatiana Moreira da Silva. – 2012.
xiii, 103 f. : il., figs, tabs.

Orientador: Prof. Dr. Mário Silva Approbato.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Goiás, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, 2012.

Bibliografia.

Inclui lista de figuras, abreviaturas, siglas, quadros, símbolos e tabelas.

Anexos.

1. Infertilidade masculina. 2. Suplementos antioxidantes. 3. Ácido fólico. 4. Espermograma. I. Título.

CDU: 616.697

**BANCA EXAMINADORA DA DISSERTAÇÃO DE
MESTRADO**

Aluna: TATIANA MOREIRA DA SILVA

Orientador: PROF. DR. MARIO SILVA APPROBATO

Membros:

1. DR. MÁRIO SILVA APPROBATO

2. DRA. MARTA CURADO CARVALHO FRANCO FINOTTI

3. DR. RUY GILBERTO FERREIRA

OU

4. DR. WALDEMAR NAVES DO AMARAL

5. DR. RODOPIANO SOUSA FLORÊNCIO

Data: 06/ 07/ 2012

Dedico este trabalho...

Aos meus queridos pais Geraldo e Maria de Lourdes, que são exemplos de honestidade e nobreza de caráter. Esse trabalho é de vocês! Obrigada pelos bons exemplos e por me ensinarem a ter fé de que o esforço vale a pena. Papai obrigada pelo sacrifício de tantos investimentos na minha formação e das minhas irmãs, sempre nos incentivando aos estudos. Mamãe obrigada pelo zelo, dedicação e paciência incondicional.

As minhas irmãs, Keila e Cristiane pelo apoio e auxílio. Cada uma de vocês teve um papel especial para que eu chegasse até aqui. Continuem se esforçando dentro das suas profissões, pois tenho a certeza de que serão recompensadas.

Ao meu namorado Ricardo, obrigada pelo companheirismo e confiança nas minhas escolhas. Obrigada, sobretudo pela compreensão nos momentos em que estive ausente. Amo você!

Aos meus anjos mais preciosos Júlia, Miguel e Eduardo, desejo que vocês cresçam confiantes em Deus. Que possam hoje plantar a sementinha da sabedoria divina e ir colhendo seus frutos por toda a vida. Perdão pela ausência em algumas ocasiões. A dindinha ama muito vocês!

À minha amiga Rosana, exemplo de força e otimismo. Obrigada pela torcida e boas vibrações em meu favor por incontáveis vezes. Que Deus lhe proporcione a graça de encontrar um companheiro especial, conforme você merece e deseja.

Às colegas de trabalho, Mônica, Jalsi, Shirley, Marisa, Coracy e Zélia, vocês também fazem parte dessa conquista!

AGRADECIMENTOS

Agradeço a **DEUS**. Obrigada Pai pela oportunidade do aprendizado. Agradeço pela vida, saúde, proteção e tantas bênçãos. Que eu tenha sabedoria para conduzir todas as conquistas alcançadas em minha vida, segundo a vossa vontade Pai.

Aos pacientes que participaram do estudo. Sem vocês esse trabalho não teria sido possível! Obrigada pela disposição, consentimento e colaboração. Sinto respeito e um grande carinho por todos. Que o conhecimento aqui gerado possa se multiplicar e ajudar aqueles que necessitam de tratamento em infertilidade.

A toda equipe do Laboratório de Reprodução Humana do Hospital das Clínicas da UFG que contribuiu no desenvolvimento dessa pesquisa. Sem o precioso auxílio de cada um de vocês não seria possível essa realização. Em especial, à Dra. Mônica Canêdo pela paciência, tolerância, compreensão e companheirismo em tantos momentos difíceis.

À Dra. Jalsi Tacon pelo imensurável auxílio, sobretudo naqueles dias de maior estresse (não oxidativo). Palavras seriam poucas para expressar minha gratidão.

Ao Prof. Dr. Mário Silva Approbato agradeço pela oportunidade. Obrigado por contribuir para o meu crescimento profissional e pessoal.

Ao corpo docente do Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde. Obrigado pelo conhecimento repassado. Suas experiências transmitidas são fundamentais para a formação de bons pesquisadores.

À Valdecina e à Raquel, do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Goiás, pela atenção, paciência e empenho.

A todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

	Página
Figuras, Tabelas e Quadros.....	ix
Siglas, Símbolos e Abreviaturas.....	x
Resumo.....	xii
Abstract.....	xiii
1. INTRODUÇÃO.....	14
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	17
2.1 PREVALÊNCIA.....	17
2.2 ETIOLOGIA.....	18
2.2.1 Fatores ambientais e estilo de vida.....	18
2.2.2 Fatores nutricionais.....	19
2.2.3 Estresse oxidativo e espécies reativas de oxigênio.....	21
2.2.4 Fontes de espécies reativas de oxigênio.....	22
2.3 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL.....	24
2.3.1 Conceitos.....	25
2.4 TRATAMENTO DA SUBFERTILIDADE MASCULINA.....	26
2.4.1 Antioxidantes – terapias alternativas pela suplementação.....	26
2.4.1.1 Antioxidantes enzimáticos.....	28
2.4.1.2 Antioxidantes não enzimáticos.....	29
2.5 SUPLEMENTAÇÕES <i>IN VITRO</i> COM ANTIOXIDANTES...	31
2.6 SUPLEMENTAÇÃO COM ANTIOXIDANTES NA INFERTILIDADE MASCULINA – EFEITOS <i>IN VIVO</i>	35
2.7 ESTRATÉGIAS FUTURAS – MEDIDAS DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO.....	38
2.7.1 Ensaio diretos.....	39
2.7.2 Ensaio indiretos.....	39
3. OBJETIVOS.....	40
3.1 OBJETIVO GERAL.....	40
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	40
4. METODOLOGIA.....	41

4.1 ASPECTOS ÉTICOS.....	41
4.2 DESENHO DO ESTUDO.....	41
4.3 PROTOCOLO DA PESQUISA.....	41
4.4 PACIENTES E MÉTODOS.....	43
4.4.1 Critérios de inclusão.....	43
4.4.2 Critérios de exclusão.....	43
4.4.3 Grupo de estudo.....	43
4.5 ANÁLISE DO SÊMEN.....	44
4.5.1 Exame macroscópico.....	44
4.5.2 Exame microscópico.....	45
4.6 ESTATÍSTICA.....	47
5. PUBLICAÇÕES.....	48
5.1 ARTIGO 1.....	49
5.2 ARTIGO 2.....	59
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	72
7. REFERÊNCIAS.....	73
ANEXOS.....	85
ANEXO I – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa.....	85
ANEXO II – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	86
ANEXO III – Ficha de Atendimento – Coleta de Dados.....	89
ANEXO IV – Normas de Publicação <i>JBRA Assisted Reproduction</i>	90
ANEXO V – Normas de Publicação <i>Reproductive Biomedicine Online</i>	92

FIGURAS, TABELAS E QUADROS

	Página
Figura 1. Estresse Oxidativo e Infertilidade Masculina.....	22
Figura 2. Mecanismo de produção de ERO pelos espermatozóides imaturos.....	24
Figura 3. Balanço entre oxidantes e antioxidantes influenciando a qualidade espermática.....	31
Figura 4. Câmara de Makler e sua representação gráfica.....	46
Quadro 1. Valores de referência do sêmen, OMS 1999.....	26
Quadro 2. Principais agentes de defesa antioxidantes.....	27
Quadro 3. Número de casos em estudos similares que também avaliaram o efeito da suplementação com antioxidantes nos parâmetros seminais.....	44

SIGLAS, SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

μ	micra
μL	microlitro
\geq	maior ou igual
mL	mililitro
mm	milímetro
mm^2	milímetro quadrado
mm^3	milímetro cúbico
mM	milimolar
nM	nanomolar
CAT	catalase
CK	creatina quinase
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EO	Estresse Oxidativo
ERO	Espécies Reativas de Oxigênio
FIV	Fertilização <i>In Vitro</i>
FM/UFG	Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Goiás
G-6-PD	Glicose 6-fosfato desidrogenase
H_2O_2	Peróxido de hidrogênio
HC/UFG	Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás
IAIU	Inseminação Artificial Intrauterina
ICSI	<i>Intracytoplasmic Sperm Injection</i>
IMC	Índice de Massa Corporal
LabRep	Laboratório de Reprodução Humana
LDH	Lactato desidrogenase
n	Número de casos
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NWHIC	<i>The National Women's Health Information Center (USA)</i>
p	Valor probabilístico de significância
O_2^-	ânion superóxido
OAT	Oligoastenoteratozoospermia

OMS	Organização Mundial de Saúde
SOD	Superóxido dismutases
TRA	Técnicas de Reprodução Assistida
UFG	Universidade Federal de Goiás
WHO	<i>World Health Organization</i>

RESUMO

Acredita-se que a suplementação oral com antioxidantes possa reduzir os danos causados por espécies reativas de oxigênio e aumentar a capacidade de fertilização dos espermatozoides devido à melhora dos parâmetros seminais. Avaliou-se o espermograma, segundo os critérios da Organização Mundial de Saúde (1999), de homens subférteis que receberam ácido fólico na dosagem de 5 mg/dia ou placebo, comparando os resultados pré e pós tratamento. Um total de 49 pacientes com idade entre 23 a 56 anos (média 35,3 anos) e diagnóstico de subfertilidade foi randomizado em dois grupos. O grupo tratado (n= 23) recebeu ácido fólico e o grupo controle (n= 26) recebeu placebo, ambos durante 3 meses. Antes da intervenção, a concentração média de espermatozoides ($\times 10^6/\text{mL}$) no grupo tratado foi 25,91 e após o tratamento 26,08. No grupo controle foi: 20,85 pré-tratamento e 20,04 pós-tratamento ($p=0,92$). Quanto à motilidade, as médias de espermatozoides móveis progressivos obtidas nos grupos tratado e placebo, antes da terapêutica foram, respectivamente: 46,48% e 49,23%. Após a intervenção, as médias encontradas foram 48,26% no grupo tratado e 49,65% no grupo controle ($p=0,99$). A média de morfologia normal dos espermatozoides foi 23,26% no grupo tratado pré-intervenção, e posteriormente foi de 23,91%. O grupo controle apresentou média de 22,3% e 24,23%, respectivamente ($p= 0,83$). A média de vitalidade encontrada no grupo tratado foi de 66,73% antes do tratamento e 69,56% após o tratamento com ácido fólico. Já no grupo controle foi de 65,77% pré-tratamento e após foi de 65,38% não sendo significativa ($p= 0,95$). Inúmeras pesquisas têm avaliado o uso de antioxidantes para melhorar a qualidade do esperma e assim, a fertilidade. Essas substâncias foram utilizadas individualmente ou em combinação, e se diferem quanto ao tipo, à população-alvo, dose e duração da terapia. Esse estudo mostrou que o ácido fólico na concentração de 5 mg/dia não melhorou os parâmetros espermáticos de homens subférteis em comparação ao grupo controle.

Palavras-chave: infertilidade masculina; suplementos antioxidantes; ácido fólico, espermograma; estresse oxidativo.

ABSTRACT

Research shows that oral supplementation with antioxidants can reduce the damage caused by reactive oxygen species and increase the fertilizing capacity of sperm due to improvement in semen parameters. Semen analysis was assessed according to the criteria of the World Health Organization (1999), subfertile men who received folic acid at a dose of 5 mg/day or placebo, comparing results before and after treatment. A total of 49 patients aged 23-56 years (mean 35.3 years) and diagnosis of subfertility were randomized into two groups. The treated group (n= 23) receiving folic acid and the control group (n= 26) received placebo, each for 3 months. Before the intervention, the mean sperm concentration ($\times 10^6/\text{mL}$) in the treated group was 25.91 and 26.08 after treatment. In the control group was: 20.85 pre-treatment and 20.04 after treatment ($p= 0.92$). Means of progressive motile sperm obtained from the treated and placebo groups before treatment were, respectively: 46.48% and 49.23%. After the intervention, the mean values found were 48.26% in the treated group and 49.65% in the control group ($p= 0.99$). The mean normal sperm morphology was 23.26% in the treated group pre-intervention, and later was 23.91%. The control group had an average of 22.3% and 24.23%, respectively ($p= 0.83$). Mean vitality found in the treated group was 66.73% before the treatment and 69.56% after the treatment with folic acid. In the control group was 65.77% after pre-treatment and 65.38% was not significant ($p= 0.95$). Numerous studies have evaluated the use of antioxidants for improving sperm quality and thus fertility. These substances are used individually or in combination, and differ in the type, the target population, dosage and duration of therapy. This study showed that folic acid at a concentration of 5 mg / day did not improve sperm parameters in subfertile men compared to the control group.

Keywords: male infertility; antioxidants supplements; folic acid; semen analysis; oxidative stress.

1. INTRODUÇÃO

A Organização Mundial de Saúde (OMS) define infertilidade como a incapacidade em obter gravidez clínica após doze ou mais meses de relações sexuais regulares sem adequada proteção contraceptiva (ZEGERS-HOCHSCHILD et al., 2009). Entretanto, em alguns casos, mesmo após esse período de tempo, a gravidez pode ocorrer naturalmente ou por tratamentos e técnicas específicas. Assim, alguns autores consideram mais adequado usar o termo subfertilidade para referir-se a esses casais que necessitam de mais tempo que o habitual para conseguir gravidez (WONG et al., 2000).

Estima-se que oitenta milhões de pessoas mundialmente são afetadas pela incapacidade de terem filhos. Esse problema afeta por volta de 15% dos casais em idade reprodutiva em todo o mundo. Deste montante, o fator masculino representa aproximadamente 50% dos casos (WONG, 2000; SHOWELL et al., 2009; HAMADA et al., 2011). Uma revisão feita por TREMELLEN (2008) mostra que um homem a cada vinte na população geral será afetado por subfertilidade.

O espermograma é um dos testes laboratoriais que avalia a qualidade do sêmen. Entre os fatores determinantes da infertilidade masculina temos alterações na produção de espermatozóides podendo haver ausência dessas células (azoospermia), diminuição do seu número (oligozoospermia), alteração da sua forma (teratozoospermia), capacidade de movimento (astenozoospermia) ou vitalidade (WHO, 1999; ISIDORI, 2005; MS, 2005).

O distúrbio de três dessas variáveis, condição denominada oligoastenoteratozoospermia (OAT), constitui-se em uma das causas mais freqüentes de subfertilidade. Para um grande número de desordens andrológicas não é possível encontrar causas evidentes, assim, a maioria dos casos de infertilidade masculina são de origem idiopática (HIRSH, 2003).

As Técnicas de Reprodução Assistida (TRA), Fertilização *In Vitro* (FIV) e Injeção Intracitoplasmática de Espermatozóides (do inglês *Intracytoplasmic Sperm Injection* - ICSI), possibilitam o tratamento de casais com infertilidade por fator masculino, entretanto é usualmente empírico permanecendo desconhecida, frequentemente, a verdadeira causa da subfertilidade (EBISCH et al., 2007).

Pesquisas mostram que essas alterações espermáticas podem estar associadas à presença de altos níveis de Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) que causam danos aos lipídios, proteínas e DNA da célula. Acredita-se que o tratamento com antioxidantes por suplementação oral poderia reduzir esses danos e aumentar a capacidade de fertilização dos espermatozóides devido à melhora de alguns parâmetros espermáticos (MARTIN-DU PAN et al., 1998; ROLF et al., 1999; ALVAREZ, 2003; GRECO et al., 2005b; EBISCH et al., 2006; YOUNG et al., 2008; MENDIOLA et al., 2009; HAMADA et al., 2011). Por outro lado, outros estudos semelhantes não obtiveram resultados satisfatórios (COMHAIRE et al., 2000; LENZI et al., 2004; GRECO et al., 2005a; SIGMAN et al., 2006; TUNC et al., 2009; SAFARINEJAD, 2011).

Alguns autores referem melhora nos parâmetros de sêmen, acreditando que os antioxidantes isoladamente ou em associação com vitaminas e nutrientes, minimizam os efeitos tóxicos do estresse oxidativo nos

espermatozóides humanos (FRAGA et al., 1991; AGARWAL e SALEH, 2002; AGARWAL et al., 2005). Em infertilidade masculina, os antioxidantes frequentemente usados são: vitamina E, vitamina C, carotenóides, ubiquinol, e os micronutrientes folato e zinco (ESKENAZI, 2005; SHOWELL, 2009).

A associação de medicamentos dificulta a identificação de qual componente teria ação benéfica nos parâmetros do sêmen. Em decorrência da controvérsia da ação destes fármacos e por muitos autores terem usado associações, esse trabalho propôs-se a avaliar o efeito da suplementação com ácido fólico isoladamente na qualidade do espermograma de homens subférteis comparando, pré e pós-tratamento nesses pacientes, os parâmetros do espermograma segundo os critérios da Organização Mundial de Saúde (1999). Acreditamos que os resultados dessa pesquisa sejam úteis no esclarecimento do tema, que ainda é controverso na literatura, devido à escassez de ensaios clínicos randomizados.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 PREVALÊNCIA

Devido a diferenças nas definições e metodologias de coleta de dados, a prevalência mundial da infertilidade tem sido estimada entre 4 a 14%. O consenso internacional é que 8 a 10% dos casais em idade reprodutiva apresentam dificuldade de engravidar (GURUNATH et al, 2011). Dados de um levantamento internacional feito em 2007, cuja amostra era composta de 25 populações, mostram que o intervalo seria de 3,5-16,7% e 6,9-9,3% para países desenvolvidos e em desenvolvimento, respectivamente (BOIVIN et al., 2007; MAKUCH et al., 2010).

Nos Estados Unidos foi estimado pelo “*The National Women’s Health Information Center*” (NWHIC) que 10 a 15% dos casais são considerados inférteis conforme definição dos critérios da OMS. Entre esses, estima-se que 30% são inférteis devido a fator masculino (CHAKRABORTY, 2006).

No Brasil, segundo dados do Ministério da Saúde, mais de 278 mil casais têm dificuldade para gerar um filho em algum momento de seu período de vida fértil, sendo que os homens respondem por 40% dos casos de esterilidade (MS, 2005). Em recente pesquisa sobre o acesso da população brasileira de baixa renda às técnicas reprodução assistida foi constatado que há no país aproximadamente quatro milhões de casais inférteis (MAKUCH et al., 2011). Essa mesma autora, em 2010, afirma que embora não existam estatísticas disponíveis no Brasil sobre prevalência de infertilidade presume-se que a taxa internacional seria aplicável.

2.2 ETIOLOGIA

A infertilidade masculina é doença multifatorial e pode ocorrer devido a anormalidades urogenitais congênitas ou adquiridas, tais como: varicocele, infecções do trato genital, anomalias genéticas, distúrbios endócrinos, insuficiência testicular, fatores imunológicos, câncer, doenças sistêmicas e exposição a substâncias gonadotóxicas (DOHLE et al., 2007; PASQUALOTTO, 2007). Em 40-60% dos casos de OAT o motivo do comprometimento da fertilidade não pode ser determinado. Apesar destes homens frequentemente apresentarem exames físicos e endócrinos normais, a análise do sêmen revela um decréscimo do número e motilidade dos espermatozóides, além de alterações morfológicas. Essa condição denominada infertilidade masculina idiopática está relacionada principalmente com: estilo de vida, exposição a produtos tóxicos, hábitos alimentares e ERO (ISIDORI et al., 2006; MENDIOLA et al., 2009; HAMADA et al., 2011).

Em estudo realizado pela Organização Mundial de Saúde envolvendo 7057 indivíduos (WHO, 2000), a OAT foi identificada em 75,1% dos casos. O segundo achado mais prevalente foi varicocele, afetando 12,3% dos indivíduos, seguido da infecção urogenital (6,6%) e de fatores imunológicos (3,1%).

2.2.1 Fatores ambientais e estilo de vida

Os fatores relativos ao ambiente e estilo de vida implicados na subfertilidade são de particular interesse porque, ao contrário das causas genéticas, estes podem ser apontados para medidas preventivas e curativas (HIRSH, 2003; BARBOSA, 2009). Embora seus eventuais efeitos sobre a fertilidade ainda continuarem sendo estabelecidos, observou-se em alguns

estudos que o hábito de fumar, ingestão de álcool e alta temperatura pode afetar a qualidade seminal (MENDIOLA, 2009; COMHAIRE, 2010; IMHOF, 2011).

Segundo ESTEVES e AGARWAL (2011), fumar induz o estresse oxidativo por diminuição dos níveis de antioxidantes no plasma seminal. Esses autores citam outros efeitos adversos do tabaco sobre os espermatozóides, como por exemplo: diminuição da qualidade espermática, aumento de leucócitos e de ERO, além de danos ao DNA aumentando o risco de mutações hereditárias.

Por outro lado, WONG et al. (2000) afirmam que a exposição ocupacional a metais pesados como cádmio e chumbo pode ser espermatotóxica. O chumbo poderia ativar vias de geração de ERO.

O alcoolismo tem sido associado a perturbações da saúde reprodutiva, ocasionando impotência ou atrofia testicular (MENDIOLA et al., 2009). O consumo de grandes quantidades de álcool também aumenta os níveis sistêmicos do estresse oxidativo e seu efeito pode ser exacerbado pela alimentação fraca em nutrientes, que geralmente o acompanha (KOCH et al., 2004; BARBOSA, 2009).

2.2.2 Fatores nutricionais

Como reflexo das mudanças globais no comportamento alimentar, a prevalência de dietas pouco saudáveis, caracterizadas por baixa ingestão de frutas e legumes associada ao elevado consumo de alimentos ricos em gorduras saturadas, tem aumentado entre mulheres e homens na faixa etária reprodutiva (VUJKOVIC et al., 2009). Assim, WONG et al. (2000) afirmam que

deficiências nutricionais podem ser uma importante causa afetando a fertilidade masculina, havendo necessidade de mais investigações a esse respeito.

Alguns trabalhos associam o baixo consumo de micronutrientes antioxidantes, como a vitamina A, C e E, carnitinas, ácido fólico, zinco e selênio, com infertilidade masculina (FRAGA et al., 1991; WONG et al., 2002; GRECO et al., 2005a; SHOWELL et al., 2009; MENDIOLA et al., 2010). Há evidências sobre o papel desses nutrientes na manutenção da espermatogênese normal e maturação dos espermatozóides, bem como no metabolismo, síntese, reparação e transcrição do DNA dessas células. Além disso, constatou-se que a deficiência de vitamina A provoca degeneração das células germinativas (KWIECINSKI et al., 1989; VAN PELT e DE ROOIJ, 1991; CIERESZKO e DABROWSKI, 1995; WONG et al., 2000; YONG et al., 2008).

Uma observação comum no mundo ocidental é o aumento do Índice de Massa Corporal (IMC) na população. Vários estudos associaram baixos parâmetros espermáticos a homens com IMC acima ou abaixo dos valores normais (BARBOSA, 2009; MENDIOLA et al., 2010). Entretanto, em um artigo de revisão, PENZIAS (2012) analisou o impacto de fatores relacionados ao estilo de vida, dentre eles a obesidade, em casos de falha recorrente de fertilização *in vitro*. Esse autor ressalta o estudo de KUPKA et al. (2011) no qual foram encontradas mais altas de gravidez clínica em casais cujo companheiro do sexo masculino era obeso e a mulher tinha peso normal, comparado a casais não obesos. Uma possível explicação para o curioso sucesso poderia ser o maior consumo de micronutrientes pelos parceiros obesos resultando em melhor qualidade seminal.

2.2.3 Estresse oxidativo (EO) e espécies reativas de oxigênio (ERO)

A primeira indicação da geração de espécies reativas do metabolismo do oxigênio pelo espermatozóide de mamíferos e seus efeitos na função espermática, foram relatados por MACLEOD em 1943. No entanto, foi somente a partir dos anos 70 que as pesquisas sobre o papel das ERO na fisiopatologia espermática de várias espécies se intensificaram (MAIA et al., 2010).

Homens subférteis apresentam níveis mais altos de ERO no sêmen quando comparado aos férteis. Essa condição associa-se à disfunção espermática, danos ao DNA do esperma e redução do potencial reprodutivo (TREMELLEN et al., 2007; RAMASAMY et al., 2012). Os espermatozóides são sensíveis ao estresse oxidativo porque carecem de defesas citoplasmáticas. Além disso, a membrana plasmática dessas células contém ácidos graxos poliinsaturados os quais são vulneráveis ao ataque por ERO que desencadeiam reações químicas de peroxidação lipídica (AGARWAL e SALEH, 2002). ERO podem também causar danos ao DNA por deleções, mutações e outros defeitos genéticos letais.

É difícil bloquear a lesão por estresse oxidativo nas células e tecidos porque ERO são continuamente produzidas pelo metabolismo celular aeróbico (Figura 1). Atualmente experiências clínicas tentam minimizar os efeitos tóxicos do estresse oxidativo induzido por lesão aos espermatozóides humanos. Entre as medidas de proteção disponíveis temos: mudanças no estilo de vida, aumento no consumo de antioxidantes pela dieta, prevenção de danos oxidativos iatrogênicos, através da adição de suplementos no meio de cultura durante a preparação do sêmen e administração de pentoxifilina como fármaco (AGARWAL et al., 2005).

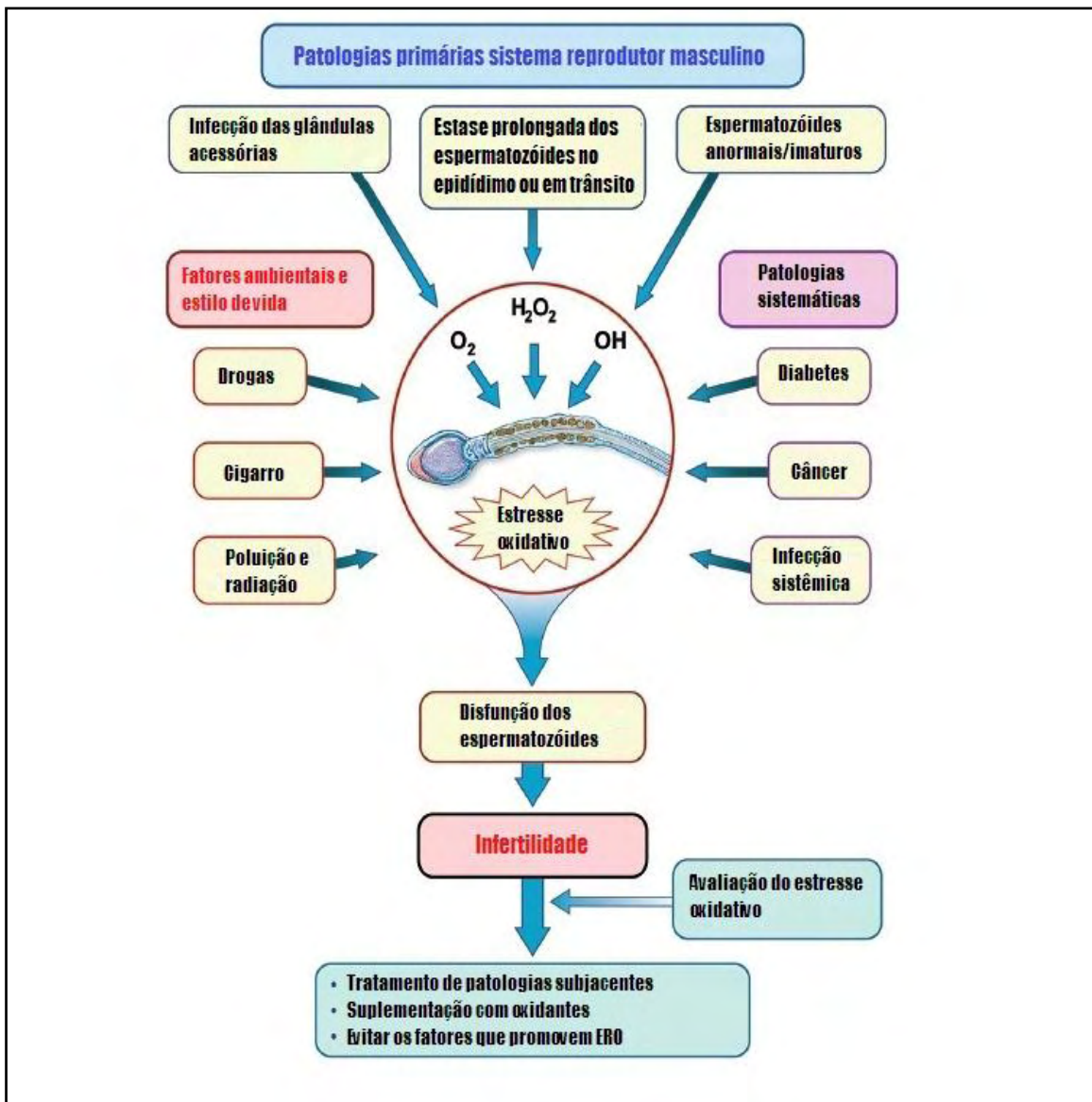


Figura 1. Estresse oxidativo e infertilidade masculina (Esteves e Agarwal, 2011, modificado).

2.2.4 Fontes de espécies reativas de oxigênio

O sêmen humano constitui-se de diferentes tipos de células tais como: espermatozoides maduros e imaturos, células redondas de diferentes estágios do processo de espermatogênese, leucócitos e células epiteliais. Destes, os espermatozoides imaturos e os leucócitos (neutrófilos e macrófagos) são as duas principais fontes de geração de ERO. Acredita-se que isso ocorra em resposta a infecções sendo a primeira linha de defesa contra microorganismos (AGARWAL et al., 2008a; TREMELLEN, 2008).

A leucocitospermia é associada com diminuição da concentração, motilidade e morfologia espermática, assim como reduzida capacidade de hiperativação e fertilização (KEFER et al., 2009). Apesar de sua relevância no potencial de fecundação do paciente, permanece difícil de ser quantificada, podendo, todavia, ser considerada um marcador de inflamação urológica e de possível disfunção espermática (BARBOSA, 2009).

Verificou-se que os espermatozóides formam as ERO independentemente dos leucócitos e que esta capacidade depende do seu nível de maturação. A retenção de excessivo citoplasma residual correlaciona-se com baixa qualidade seminal e elevada concentração de ERO. Pensa-se que esses espermatozóides sejam imaturos e funcionalmente defeituosos (EBISCH et al., 2007; AGARWAL et al., 2008a). Por conseguinte, níveis elevados de ERO no sêmen estão correlacionados negativamente com a morfologia normal e positivamente com o índice de malformação dos espermatozóides (AGARWAL et al., 2004).

Os resíduos citoplasmáticos contêm elevados níveis da enzima glicose-6-fosfato desidrogenase, que forma o NADPH (nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato). Este por sua vez, forma espécies reativas de oxigênio via NADPH oxidase na membrana espermática (SAID et al., 2005, TOHAMY, 2012) [Figura 2]. Além disso, à medida que a concentração de espermatozóides imaturos aumenta no ejaculado, aumenta também a concentração de espermatozóides maduros com DNA danificado (AGARWAL et al., 2008a).

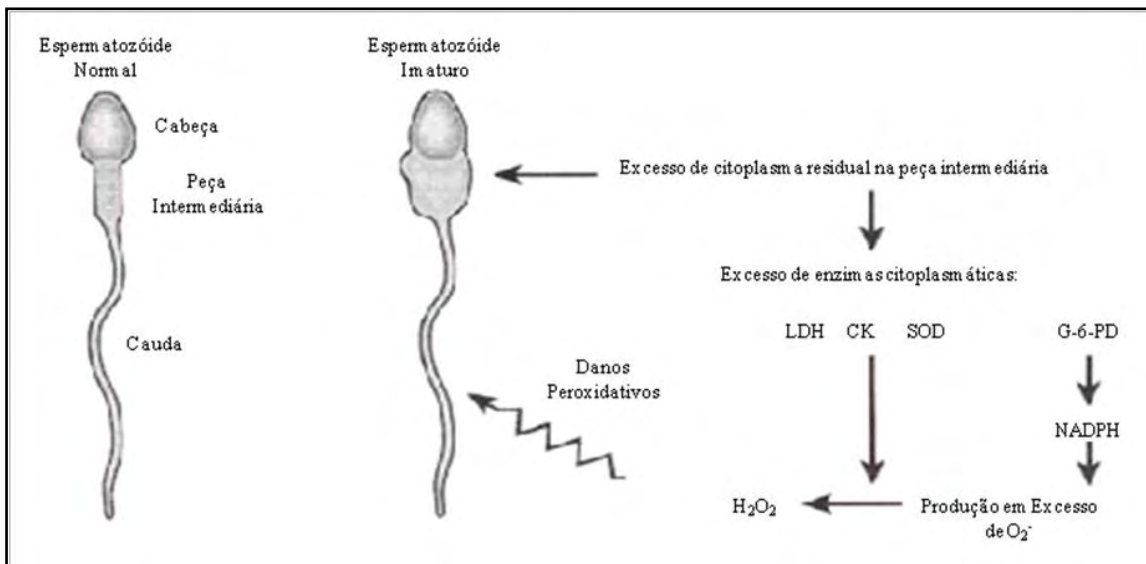


Figura 2. Mecanismo de produção de ERO pelos espermatozóides imaturos. LDH – lactato desidrogenase, CK – creatina quinase, SOD – superóxido dismutase, G-6-PD - glicose-6-fosfato desidrogenase, NADPH – nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato, H₂O₂ – peróxido de hidrogênio e O₂⁻ – ânion superóxido. Fonte: TOHAMY, 2012 (modificado).

Embora tanto os leucócitos como os espermatozóides produzam ERO, a concentração destas gerada por cada tipo de célula varia bastante. Foi demonstrado que os leucócitos podem produzir mais ERO que os espermatozóides após a capacitação (AGARWAL e SALEH, 2002; KEFER et al., 2009). Supõe-se que esse estresse oxidativo que induz a danos espermáticos contribua com 30 a 80% de todos os casos de infertilidade masculina (MARTIN-DU PAN et al., 1998; AGARWAL et al., 2006; VENKATESH et al., 2009; ESTEVES e AGARWAL, 2011).

2.3 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

O espermograma é um teste laboratorial comumente solicitado para verificar a presença de infertilidade masculina. Avalia parâmetros quantitativos (volume do ejaculado, pH, concentração de espermatozóides, motilidade, vitalidade e morfologia espermática) e qualitativos (cor, viscosidade, liquefação

e aglutinação). A qualidade do sêmen pode variar de maneira significativa. No mínimo dois espermogramas devem ser realizados com intervalo de pelo menos uma semana para que se estabeleça o perfil do sêmen do indivíduo. Como a duração de um ciclo germinativo é de 74 ± 14 dias, a influência desses fatores deverá ser reavaliada num ciclo subsequente, ou seja, três meses após (WHO, 1999; ESTEVES e AGARWAL, 2011).

O potencial de fertilidade de um homem é influenciado pela atividade sexual, função das glândulas sexuais acessórias entre outras condições. O espermograma fornece informações sobre essas glândulas, estado funcional dos túbulos seminíferos e epidídimo. Assim, a análise do sêmen é de fundamental importância na investigação inicial do cônjuge masculino e frequentemente resulta numa medida da sua capacidade para gerar gravidez (ESTEVES e AGARWAL, 2011).

2.3.1 Conceitos

De acordo com a OMS (1999) é classificado como subfértil, o homem que apresenta algum dos principais parâmetros seminais abaixo do valor de referência (Quadro 1). Dessa forma, estabeleceu-se nomenclatura para algumas variáveis seminais e suas definições:

- **Oligozoospermia** – Concentração de espermatozóides abaixo do valor de referência.
- **Astenozoospermia** – Motilidade menor que o valor de referência.
- **Teratozoospermia** – Morfologia abaixo do valor de referência.

- **Oligoastenoteratozoospermia** – Significa diminuição de todas as três variáveis (combinações de somente dois prefixos também podem ser utilizadas).
- **Azoospermia** – ausência de espermatozóide no ejaculado.

Quadro 1 - Valores de Referência do Sêmen, OMS 1999	
Parâmetro Analisado	Valor de Referência
Volume do ejaculado	≥ 2,0 mL
pH	≥ 7,2
Concentração de espermatozoides	≥ 20 milhões/mL
Motilidade (*)	Grau A + Grau B ≥ 50% ou Grau A ≥ 25% até 60 minutos após a coleta
Morfologia	≥ 30% espermatozoides normais
Vitalidade	≥ 50%
(*) A motilidade de cada espermatozóide é classificada como grau A, B, C ou D de acordo como ele se mostra: progressivo rápido, progressivo lento, móvel <i>in situ</i> ou imóvel, respectivamente (WHO, 1999).	

2.4 TRATAMENTO DA SUBFERTILIDADE MASCULINA

Existem evidências do decréscimo na qualidade do sêmen humano durante as últimas décadas. Muitas causas têm sido relatadas, entretanto, a maioria ainda não conclusiva (WONG et al., 2000; MENDIOLA et al., 2009). Assim, têm sido estabelecidas inúmeras estratégias de tratamento, principalmente voltadas para a aplicação de técnicas de reprodução assistida. Essas medidas têm possibilitado que casais subférteis consigam conceber, mas restringem-se apenas ao tratamento dos sintomas. Verificam-se poucos ganhos científicos na adoção de medidas preventivas e esclarecimento das causas subjacentes em infertilidade masculina (PASQUALOTTO et al., 2003; EBISCH et al., 2007).

2.4.1 Antioxidantes - terapias alternativas pela suplementação

Antioxidantes são compostos biológicos e químicos que podem reduzir o excesso de ERO permitindo atingir o equilíbrio entre formação de oxidantes

benéfica e stress oxidativo prejudicial (KEFER et al., 2009; JENSEN et al., 2011). São classificados em enzimáticos e não enzimáticos (Quadro 2). Os enzimáticos são também conhecidos como antioxidantes naturais que agem neutralizando o excesso de ERO, prevenindo danos à estrutura celular. Não enzimáticos são antioxidantes sintéticos ou suplementos alimentares (SILVA et al., 2010; SHOWELL, 2011).

Os mecanismos de defesa dos antioxidantes compreendem dois níveis de proteção: prevenção e inativação. A prevenção da formação de ERO é a primeira linha de defesa contra o dano oxidativo. Além disso, as ERO devem ser continuamente inativadas, ficando apenas uma pequena quantidade necessária para manter a função celular normal (BARBOSA, 2009).

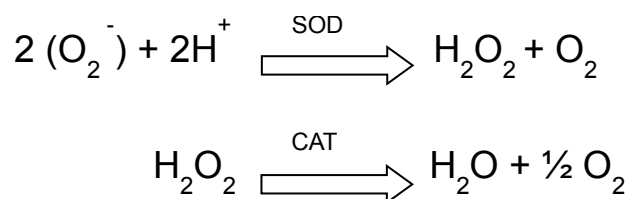
Quadro 2 – Principais agentes de defesa antioxidantes	
Antioxidantes Enzimáticos	Antioxidantes Não Enzimáticos
Superóxido dismutase, catalase, NADPH – oxidoreductase, glutathiona peroxidase, glutathiona transferase, enzimas de reparo	Melatonina (produzida pelo organismo), ácido ascórbico (vitamina C), alfa-tocoferol (vitamina E), beta-caroteno (vitamina A), ácido fólico, selênio, cobre, zinco, magnésio, fosfato, flavonoides, N-acetilcisteína, glutathiona, L-cisteína, L-carnitina, curcumina, pentoxifilina, coenzima Q10, ômega-3
Fonte: KEFER et al., 2009; SHOWELL et al., 2011.	

Naturalmente são encontrados no líquido seminal os antioxidantes: vitaminas C e E, superóxido dismutase, glutathiona e tioredoxina (ESTEVEZ e AGARWAL, 2011). Essas substâncias neutralizam o estresse oxidativo e podem ser complementadas pela dieta ou suplementação (JENSEN et al., 2011). A justificativa para o uso de terapias alternativas pela suplementação é

baseada na suposição de que podem melhorar o potencial de fertilidade masculina e a qualidade do sêmen (AHMAD et al., 2010).

2.4.1.1 Antioxidantes enzimáticos

São enzimas que desempenham um papel importante como “supressores” oxidativos (TREMELLEN, 2008). As superóxido dismutases (SOD) contêm metal e catalisam a conversão de dois superóxidos em oxigênio e peróxido de hidrogênio, que é menos tóxico. A catalase (CAT) degrada o peróxido de hidrogênio em água e oxigênio, completando assim a reação iniciada pela superóxido dismutase, de acordo com as equações abaixo:



Outras enzimas, como a glutathiona peroxidase, também podem participar no controle dos radicais de oxigênio e dos seus produtos (BARBOSA, 2009). MENNELLA e JONES (1980) demonstraram a presença de SOD no plasma seminal e nos espermatozoides humanos. Pesquisas recentes evidenciam que as concentrações de superóxido dismutase, catalase e glutathiona peroxidase do plasma seminal são significativamente mais baixas em pacientes inférteis do que em grupos controles, portanto, indicando claramente a sua implicação na fertilidade masculina (BARBOSA, 2009; SILVA et al., 2010).

2.4.1.2 Antioxidantes não enzimáticos

São também conhecidos como antioxidantes sintéticos ou suplementos alimentares. Sua ação no organismo humano é influenciada pelo consumo de vitaminas e minerais como: vitamina C, E, zinco, selênio, taurina, hipotaurina, glutathiona, beta-caroteno e caroteno. Pesquisas mostram que a vitamina E (alfa-tocoferol e derivados) previne o processo de peroxidação lipídica, atuando principalmente na membrana celular (AGARWAL et al., 2008a). Esse nutriente age como antioxidante, quebrando a cadeia dos radicais livres e promove uma limpeza, retirando as ERO antes que elas causem danos às células (SILVA, 2010).

Por outro lado, a vitamina C (ácido ascórbico) é um antioxidante hidrossolúvel que remove eficazmente os radicais: hidroxila, superóxido e o peróxido de hidrogênio. Demonstrou-se que esse elemento se encontrava em pequenas quantidades no plasma seminal de homens inférteis comparados aqueles cujo resultado da análise do sêmen estava dentro dos valores de referência (KEFER et al., 2009).

Num estudo randomizado e controlado com placebo, GRECO et al. (2005a) verificaram que o tratamento de homens com infertilidade inexplicada associada a elevada fragmentação do DNA espermático ($\geq 15\%$) com vitamina C e E, levou a redução da fragmentação do DNA sem qualquer alteração nos parâmetros seminais. Nenhum ensaio randomizado e controlado atual mostrou melhoria nos parâmetros seminais ou nas taxas de gravidez de homens inférteis com a administração oral individual de vitamina C.

A glutathiona, também classificada como antioxidante não enzimático, é um tripeptídeo composto por glutamato, cisteína e glicina. Suas propriedades

antioxidantes devem-se à presença do grupo sulfidril livre na porção cisteína, sendo agentes de redução que podem ser reversamente oxidados e reduzidos (AGARWAL et al., 2008a).

Outro nutriente com propriedades antioxidantes de particular interesse é a carnitina. Aproximadamente 75% do seu total são provenientes da alimentação. Encontra-se em concentração mais elevada no epidídimo (aproximadamente 2000 vezes mais do que no plasma). Em estudo clínico não controlado a administração oral de L-carnitina (3g/dia) durante um período de 4 meses resultou em melhoria significativa na motilidade espermática (BARBOSA, 2009).

A maior parte da capacidade antioxidante enzimática está contida no fluido seminal. As células espermáticas carecem de citoplasma e, por conseguinte, contém apenas quantidades mínimas dessas vias de eliminação de ERO (AGARWAL et al., 2008a). Em condições normais antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos atuam para manter um nível baixo de estresse oxidativo no sêmen permitindo o funcionamento normal e, concomitantemente, evitando danos celulares oxidativos (Figura 3). Efeitos patológicos surgem quando níveis de ERO não eliminadas aumentam ou a capacidade de neutralização dos antioxidantes diminui, prejudicando o equilíbrio oxidante/antioxidante (KEFER et al., 2009).

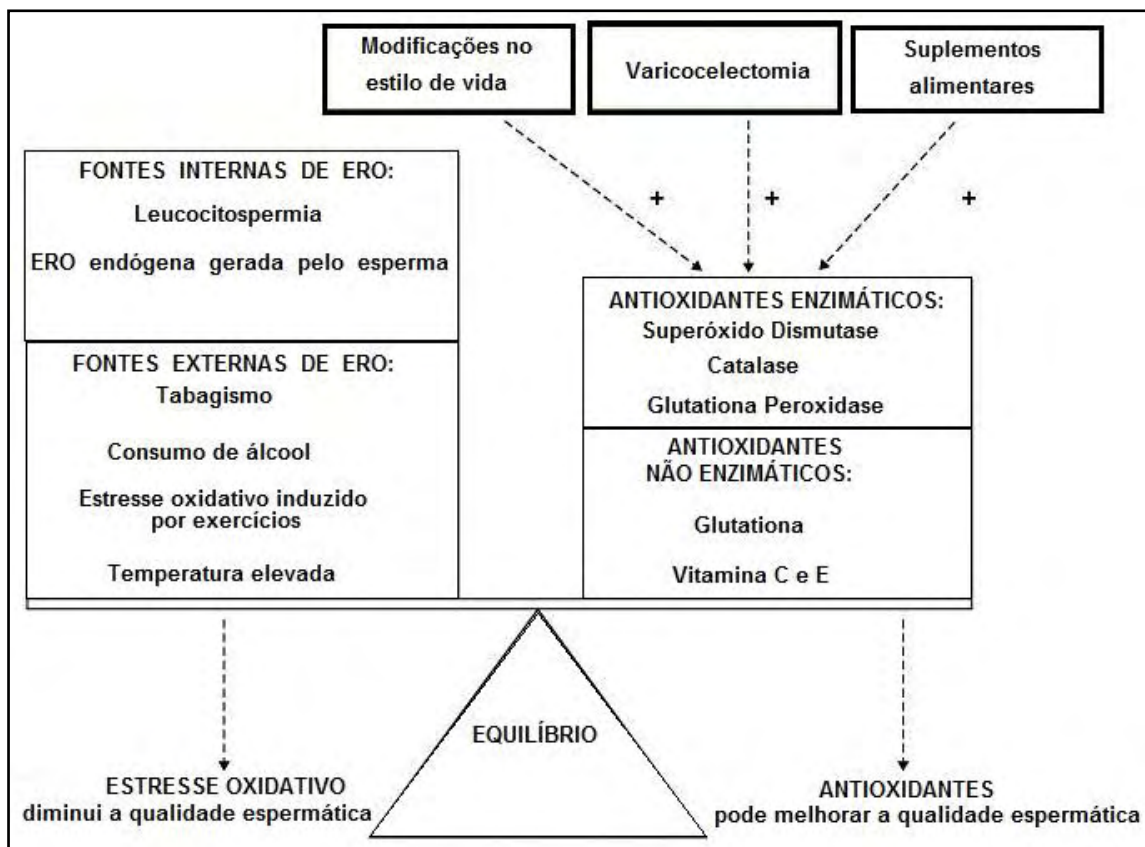


Figura 3. Balanço entre oxidantes e antioxidantes influenciando a qualidade espermática. Quando os níveis de oxidantes se encontram altos, geralmente a qualidade espermática será baixa. Por outro lado, se a capacidade antioxidante aumenta, pode haver o equilíbrio que restitui a qualidade espermática. Fonte: KEFER et al., 2009 (modificado).

2.5 Suplementações *in vitro* com antioxidantes – Histórico

As técnicas de processamento do sêmen para uso em TRA, como lavagem e centrifugação, removem parte dos elementos protetores associando-se com a geração de ERO e aumento de danos ao DNA (MAIA e BICUDO, 2010). Espermatozoides são separados do plasma seminal e oócitos do fluido folicular removendo, portanto, os gametas dos meios que os ajudam a proteger dos efeitos prejudiciais das ERO. Na maioria dos tratamentos de FIV, pelo menos 50% dos espermatozoides selecionados provêm de um ambiente com EO (SALEH et al., 2003; SIKKA, 2004; BARBOSA, 2009). Dessa forma, fatores que possam oferecer proteção aos espermatozoides são de grande importância (RUSSO, 2006; AGARWAL et al., 2008a; PLESSIS, 2010).

Na literatura encontramos a partir da década de 80 várias pesquisas que tinham por objetivo observar se algumas substâncias, quando adicionadas ao meio de cultura durante a preparação do sêmen para procedimentos de reprodução assistida, melhoravam a capacitação espermática. Assim, devido à associação entre infertilidade masculina idiopática e excesso de radicais gerados pelo estresse oxidativo, estudos avaliaram a eficácia da adição de antioxidantes e seus efeitos benéficos na capacitação de espermatozóides *in vitro*.

A suplementação do meio de cultura com peróxido de hidrogênio resultou em aumento da reação acrossômica e hiperativação dos espermatozóides durante sua capacitação. Esse processo é fundamental para que o gameta masculino penetre o oócito e ocorra a fertilização (GRIVEAU et al., 1994). Esses efeitos também foram confirmados por OEHNINGER et al. (1995), entretanto, segundo seus experimentos a ativação ideal das funções espermáticas depende da dose e tempo de exposição ao peróxido de hidrogênio.

Em extensa revisão intitulada “Papel das Substâncias Oxigênio Reativas na Infertilidade Masculina”, SHARMA e AGARWAL, 1996 ressaltam a importância de reduzir o estresse oxidativo através da suplementação do meio de cultura com antioxidantes durante TRA. A vitamina E, na concentração de 10mM, previne danos causados pela peroxidação, pois interrompe a reação em cadeia dos radicais livres. Os autores sugerem outras opções que podem ser acrescentadas durante a preparação do esperma: peróxido de hidrogênio, ácido ascórbico, que apresentam a propriedade de reduzir a oxidação de moléculas biológicas e a pentoxifilina que também tem importante papel agindo

como estimulador da motilidade dos espermatozóides, além de reduzir a formação de ERO.

Avaliou-se também a preparação de amostras de sêmen com N-acetil-L-cisteína em diferentes dosagens e controles (sem a substância). A redução significativa dos níveis de ERO foi observada após 20 minutos do preparo em concentrações de 1mg/mL. Quanto à função espermática, houve melhora na motilidade total, sem mudanças significativas na taxa de reação acrossômica (OEDA, 1997). AGARWAL e SAID (2005) confirmaram esse achado e destacam que o resultado é mais intenso em amostras com alta concentração de ERO.

A suplementação com alfa-tocoferol e ascorbato, apesar de reduzir a produção de ERO, não resultou em melhora da motilidade espermática em estudo duplo cego controlado (DONNELLY et al., 1999). Esses autores também testaram a adição de glutatona e hipotaurina durante a preparação do sêmen para TRA. Essas substâncias, isoladamente ou em combinação, não tiveram efeitos significativos sobre a motilidade progressiva ou integridade do DNA dos espermatozóides, mas proporcionaram proteção contra danos oxidativos e geração de ERO (DONNELLY et al., 2000).

Aumento nos parâmetros cinemáticos do sêmen foram observados após a suplementação *in vitro* de 2,5nM de oleiletanolamida. Essa substância, derivada do ácido oleico (presente no azeite de oliva), teve ainda outra ação benéfica reduzindo danos ao DNA dos espermatozóides. Esses efeitos podem ter ocorrido devido às suas propriedades antioxidantes que conferem ação protetora contra espécies reativas de oxigênio (AMBROSINI et al., 2006).

Extrato etanólico de própolis adicionado a amostras de esperma humano resultaram em proteção da membrana dos espermatozóides contra o ataque oxidativo induzido *in vitro* por peróxido de hidrogênio (H₂O₂), adenosina difosfato (ADP) e sulfato ferroso (FeSO₄). Além disso, verificou-se nesse estudo que essa droga natural tem a capacidade de proteger o DNA genômico por reduzir a concentração de oxidantes intracelulares. Os efeitos exibidos por própolis indicam que esse composto natural pode ter um importante papel contra a infertilidade masculina (RUSSO et al., 2006).

CHI et al. (2008) em estudo controlado investigaram se a suplementação do meio de preparação espermática com ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) e catalase resultaria em melhora dos parâmetros funcionais dos gametas. O estudo demonstrou que esses componentes diminuíram significativamente os níveis de ERO e a taxa de fragmentação do DNA dos espermatozóides. Houve melhora no percentual de reação acrossômica e motilidade do esperma.

KALTHUR et al. (2011) avaliaram o efeito crioprotetor de um potente antioxidante, a vitamina E, em ejaculados de pacientes inférteis astenozoospermicos e normozoospermicos. Seus resultados indicaram que a suplementação a 5mM melhorou significativamente a motilidade pós-descongelamento e a integridade do DNA das amostras de sêmen. A perda da função espermática e fragmentação do DNA durante a criopreservação foi associada à produção de espécies reativas de oxigênio durante o processo de congelamento/descongelamento.

2.6 Suplementação com antioxidantes na infertilidade masculina – efeitos “*in vivo*”

Pelo fato de que homens inférteis possuem níveis mais elevados de ERO no sêmen e dessas substâncias causarem disfunção ao esperma, com redução do potencial reprodutivo, tem-se tratado esses pacientes com antioxidantes. Entretanto, o mecanismo exato de ação dessa molécula e o suplemento dietético ideal ainda não foram estabelecidos (ZINI e AL-HATHAL, 2011; RAMASAMY et al., 2012).

Antioxidantes estão presentes nas frutas, nos vegetais e nos suplementos alimentares. Compostos orgânicos como, por exemplo, a vitamina E (alfa-tocoferol), vitamina C (ácido ascórbico) e vitamina A (carotenóides), presentes na alimentação, são importantes para restabelecer e manter o equilíbrio oxidante/antioxidante nos tecidos (ROLF et al., 1999; YOUNG et al., 2008). O possível mecanismo de ação desses elementos seria a captura de radicais livres interferindo com a cadeia de reações químicas que levam à peroxidação lipídica (BARBOSA, 2009). A suplementação dessas substâncias em homens para tratamento da infertilidade é bastante especulativa. Há controvérsias se conseguirá de fato aumentar os níveis de antioxidantes no trato reprodutor e nos próprios gametas (BARBOSA, 2009).

Alguns ensaios mostram melhora na qualidade espermática de pacientes com fator masculino de infertilidade após administração oral de antioxidantes (WONG et al., 2002; EBISCH et al., 2006; PARADISO-GALATIOTO et al., 2008; OMU et al., 2008; BALERCIA et al., 2009; SAFARINEJAD e SAFARINEJAD, 2009; AHMAD et al., 2010; GHANEM et al. 2010; IMHOF et al., 2011; SAFARINEJAD, 2011a; SAFARINEJAD, 2011b),

enquanto outros não encontraram alteração nos parâmetros seminais em homens subférteis (ROLF et al., 1999; COMHAIRE et al., 2000; LENZI et al., 2004; GRECO et al., 2005a; SIGMAN et al., 2006; TUNC et al., 2009; SAFARINEJAD et al., 2011).

Alguns estudos de intervenção em homens férteis e subférteis com dosagens terapêuticas de ácido fólico, zinco e antioxidantes realizados desde o início da década de 90, mostraram significativo aumento na contagem de espermatozóides (BENTIVOGLIO et al., 1993; MOILANEN et al., 1993; KESSOPOULOU et al., 1995; ROLF et al., 1999; WONG et al., 2002; EBISCH et al., 2006, 2007). COMHAIRE et al. (2000) sugerem que o folato contrabalança as ERO através de suas propriedades antioxidantes. Foi evidenciado que a deficiência desse micronutriente resulta em aumento de homocisteína no plasma seminal que, por sua vez, induz ao estresse oxidativo e apoptose, sendo essa condição associada com aneuploidia espermática (BOXMEER, 2008; YOUNG et al., 2008) e baixa contagem de espermatozóides (VUJOVIC et al., 2009).

A literatura atual sugere como opção de tratamento carnitina e as vitaminas C e E por terem se mostrado eficazes em melhorar os parâmetros de análise seminal em estudos bem conduzidos. Por outro lado, zinco, ácido fólico e ervas medicinais têm sido usados também para melhorar a qualidade do sêmen, embora ainda não existam evidências claramente estabelecidas do efeito benéfico (RAMASAMY et al., 2012).

MENDIOLA et al. (2010), em estudo caso-controle, comparou o consumo de nutrientes específicos entre pacientes normospérmicos e oligoastenoteratospérmicos. Após regressão logística foi verificado que os

indivíduos do grupo controle (normozoospermicos) tinham ingestão significativamente maior de carboidratos, fibras, folato, vitamina C e licopeno aliado a menor ingestão de proteínas e gordura total. Os autores concluíram que uma baixa ingestão de nutrientes antioxidantes está associada com pobre qualidade do sêmen em homens espanhóis atendidos em clínicas de infertilidade. Esses achados também foram confirmados por LEWIS et al. (2006). Os pesquisadores observaram que homens com menor ingestão de antioxidantes pela dieta apresentavam motilidade espermática menor. O consumo diário de frutas e vegetais, bem como a ingestão de vitamina C, foram significativamente mais baixos entre homens inférteis do que em indivíduos controle.

Dados publicados em revisão sistemática da COCHRANE (2011) afirmam que as suplementações combinadas têm mostrado aumento nas taxas de fertilização. Foram incluídos na pesquisa os ensaios clínicos randomizados que comparam qualquer tipo ou dose de suplemento antioxidante (simples ou combinado) com placebo, nenhum tratamento ou outro antioxidante. Após a inclusão de 34 estudos com 2876 casais no total, observou-se que a utilização de antioxidante, pelos parceiros do sexo masculino, foi associada com um aumento estatisticamente significativo nas taxas de gravidez e de nascidos vivos em relação ao controle. Nenhum estudo relatou efeitos colaterais danosos das terapias antioxidantes usadas. Infelizmente essa meta-análise não identificou agentes específicos ou dosagem ideal para recomendar no tratamento de homens inférteis.

A combinação de L-carnitina, L-arginina, zinco, vitamina E, glutathione, selênio, co-enzima Q10 e ácido fólico foi usada durante três meses para

tratamento de pacientes subférteis do sexo masculino. O grupo tratado ingeriu diariamente duas cápsulas do composto ativo. Os resultados indicaram aumento significativo do volume ejaculatório, concentração, motilidade (progressiva e total) e da porcentagem de morfologia normal dos espermatozoides, em comparação ao grupo controle. Não foram encontrados efeitos adversos havendo 34 gestações relatadas no após seis meses de tratamento (11 ocorridas no grupo controle e 23 no grupo tratado, IMHOF et al., 2011).

2.7 ESTRATÉGIAS FUTURAS – Medidas de ERO

AGARWAL et al. (2008a) advertem que a avaliação do estado de estresse oxidativo e utilização de antioxidantes não são rotina na prática clínica. Os autores ressaltam a importância de se estabelecer valores de referência para ERO acima dos quais antioxidantes podem ser usados no tratamento da infertilidade masculina. A dose e tempo de exposição a esses agentes também devem ser normatizados. Com o aumento da utilização de TRA, deve haver um esforço em desenvolver combinações de antioxidantes que complementem os meios de preparação do esperma.

AGARWAL et al. (2005), demonstraram que a determinação dos níveis de ERO no sêmen poderia ser útil para prever resultados em ciclos de FIV, pois estavam significativamente relacionados com a taxa de fertilização. Atualmente, a investigação padronizada em infertilidade masculina não inclui a estimativa dos níveis de estresse oxidativo devido ao custo excessivo do exame e ausência de medida standardizada. Foram descritos mais de 30 testes que podem ser diretos ou indiretos (KEFER et al., 2009).

2.7.1. Ensaio direto

Ensaio direto de estresse oxidativo medem o balanço entre a produção de ERO e quantidade antioxidantes intra e extracelulares que neutralizam essas substâncias. A análise mais utilizada mede o malondialdeído, um dos produtos finais da peroxidação lipídica da membrana celular espermática (ESTEVES e AGARWAL, 2011). A quantificação dos danos ao DNA espermático tem sido também utilizada como teste direto dos danos intracelulares induzidos pelas ERO (AGARWAL et al., 2008b; KEFER et al., 2009).

2.7.2. Ensaio indireto

O método indireto mais comum de medir as ERO seminais é através de quimioluminescência. Sondas de luminol ou lucigenina podem ser usadas para a quantificação das reações de redução-oxidação dos espermatozoides (BARBOSA, 2009). A lucigenina mede apenas os radicais superóxido extracelulares e, portanto, o luminol é geralmente mais utilizado, já que mede os níveis de ERO tanto extra como intracelulares (AGARWAL, et al., 2008b).

Estes testes, tanto diretos como indiretos, foram desenvolvidos para quantificar o nível de stress oxidativo de homens que sofrem de infertilidade, com o objetivo de traçar um plano terapêutico que diminua o estresse oxidativo e melhore globalmente a qualidade seminal. Apesar de cada teste oferecer vantagens, o custo e a complexidade destes instrumentos impedem a sua vasta difusão pelos laboratórios (KEFER et al., 2009).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito da suplementação com ácido fólico (5 mg/dia) nos principais parâmetros do espermograma de homens subférteis segundo os critérios da OMS, 1999.

3.2 Objetivos Específicos

- Verificar a capacidade desse micronutriente de aumentar a concentração dos espermatozóides;
- Avaliar se houve melhora significativa na motilidade espermática;
- Observar o efeito na morfologia dos gametas;
- Analisar possível melhoria na vitalidade dos espermatozóides.

4. METODOLOGIA

4.1 ASPECTOS ÉTICOS

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás (CEP/HC-UFG) conforme protocolo nº 050/2009 (Anexo I). O termo de consentimento livre e esclarecido aplicado para realização deste trabalho está de acordo com as normas do CEP/HC-UFG (Anexo II). A obtenção do consentimento ocorreu na consulta médica, após orientação detalhada ao paciente sobre pesquisa, feita pela pesquisadora responsável.

4.2 DESENHO DO ESTUDO

Trata-se de um ensaio clínico randomizado placebo controlado realizado no Laboratório de Reprodução Humana do Hospital das Clínicas da UFG (LabRep/HC- UFG), no período de 2009 a 2011. O estudo incluiu pacientes do sexo masculino em acompanhamento no serviço cujo desejo reprodutivo persistia por um período ≥ 1 ano de tentativas em obter gravidez sem sucesso. Foram observados resultados de espermograma desses indivíduos sendo selecionados aqueles com diagnóstico de subfertilidade.

4.3 PROTOCOLO DA PESQUISA

Os possíveis sujeitos da pesquisa foram avaliados duas vezes antes do recrutamento para participação no estudo. Seguindo os critérios da OMS (1999) e para confirmar o diagnóstico de subfertilidade, foi solicitado aos

pacientes que realizassem dois espermogramas, com intervalo mínimo de 15 dias entre o primeiro e o segundo exame. Além disso, foi requerida abstenção da atividade sexual ou masturbação por 2 a 5 dias antes das coletas.

Indivíduos cujo resultado apresentava algum tipo de alteração que permanecia após realização do segundo exame eram convidados a participar da pesquisa. Nesse trabalho foram considerados subférteis pacientes com uma das seguintes alterações no resultado do espermograma: oligozoospermia, astenozoospermia, teratozoospermia ou ainda, duas ou três dessas anormalidades associadas.

Os pacientes foram randomizados em dois grupos: tratado e controle. Indivíduos do grupo tratado receberam 5 mg de ácido fólico por dia, durante 3 meses. Similarmente, o grupo controle recebeu um comprimido de placebo por dia. As drágeas foram produzidas em farmácia de manipulação sendo garantido o controle de qualidade dos fármacos. Os frascos de medicamento continham 90 cápsulas e estavam codificados como “Medicamento A” e “Medicamento B”. Somente após a finalização da coleta de dados foi revelado qual paciente recebeu placebo ou ácido fólico. Os pacientes foram orientados a colher uma terceira amostra de sêmen após o término da medicação, cumprindo abstinência de 2 a 5 dias.

A escolha do micronutriente ácido fólico justifica-se por ser largamente empregado, inclusive em gestantes para diminuir o risco de malformação do tubo neural (TAMURA e PICCIANO, 2006), com muito baixa incidência de efeitos adversos. Além disso, há na literatura evidência científica da ação antioxidante desse medicamento, nessa dosagem, em associação com

vitaminas no tratamento de homens subférteis com efeito benéfico ou neutro (RAMASAMY, 2012).

4.4 PACIENTES E MÉTODOS

As informações dos pacientes e resultados dos espermogramas foram anotadas em uma ficha de atendimento (Anexo III), sendo posteriormente transferidos a uma planilha do Excel (Microsoft Office Excel 2010[®]) para criação e gerenciamento do banco de dados.

4.4.1 Critérios de inclusão

- Pacientes do sexo masculino em acompanhamento no LabRep/HC-UFG com diagnóstico de subfertilidade segundo os critérios da OMS, 1999;
- Não usar suplementos ou vitaminas adicionais concomitantes ao consumo da medicação fornecida para realização da pesquisa;
- Não modificar os hábitos alimentares durante o período de três meses.

4.4.2 Critérios de exclusão

- FSH elevado (hipogonadismo hipergonadotrófico);
- Hipogonadismo primário e secundário;
- Azoospermia;
- Tratamento com clomifeno.

4.4.3 Grupo de estudo

Inicialmente a população do trabalho consistia de 80 pacientes que cumpriam todos os requisitos de inclusão. Porém, 31 pacientes foram excluídos por razões diversas: falhas na administração do medicamento (n= 07), não comparecimento ao exame de retorno após quatro tentativas de agendamento

(n= 10), recusa em participar da pesquisa (n= 09), gravidez espontânea (n= 01) ou causas desconhecidas (n= 04). Dessa forma, 49 pacientes realizaram com sucesso o protocolo de estudo. Essa amostra é semelhante a dos seguintes autores representados abaixo (Quadro 3):

Quadro 3 – Número de casos em estudos similares que também avaliaram o efeito da suplementação com antioxidantes nos parâmetros seminais		
Autor	Tipo de estudo	n
KESKES-AMAR et al. (2003)	DC, R, NC	48
COMHAIRE et al. (2005)	DC, R, C	30
TREMELLEN et al. (2007)	DC, R, C	52
PARADISO GALATIOTO et al. (2008)	DC, R, C	42
PIOMBINI et al. (2008)	R, NC	51
OMU et al. (2008)	DC, R, C	45
BARBOSA (2009)	DC, R, C	30
TUNC et al. (2009)	NR, NC	50
HAWKES et al. (2009)	DC, R, C	44
GHANEM et al. (2010)	DC, R, C	60
n: número de casos, DC: duplo-cego, R: randomizado, NR: não randomizado, C: controlado, NC: não controlado		

4.5 ANÁLISE DO SÊMEN

Amostras foram obtidas por masturbação em frascos de plástico atóxico estéreis. Imediatamente após a coleta, eram mantidas em incubadora a 37°C entre 15 a 60 minutos, para se obter a liquefação completa. O processamento seminal seguiu as diretrizes da OMS, 1999.

4.5.1 Exame macroscópico

As características examinadas na amostra a fresco foram:

- **Aspecto:** cor, opacidade, transparência, presença de corpos mucosos ou gelatinosos. A amostra normal é branca, opalescente, homogênea e se liquefaz em menos de 60 minutos.
- **Liquefação e viscosidade:** são consideradas normais amostras que se liquefazem entre 15 a 60 minutos. A viscosidade é avaliada pelo método de

gotejamento do sêmen, sendo normal quando há formação gotas e aumentada quando se verifica um filamento maior que dois centímetros no processo.

- **Volume e pH:** o volume foi medido em tubo cônico de polipropileno graduado, capacidade para 15 mL (Corning 430791). A medida do pH foi realizada através do método de comparação visual utilizando a fita universal Macherey-Nagel (pH-Fix 0-14). Os valores de referência para o volume e pH são, respectivamente, $\geq 2,0$ mL e $\geq 7,2$ (OMS, 1999).

4.5.2 Exame microscópico

Avalia os parâmetros concentração, motilidade, morfologia e vitalidade espermáticas, além da presença de outros elementos celulares, como leucócitos e células germinativas imaturas.

- **Concentração:** Foi colocado 5 μ l da amostra bem homogeneizada e liquefeita numa câmara especializada para a análise de sêmen, (câmara de Makler, Sefi Medical Instruments, Haifa, Israel). Esta câmara possui profundidade de 0,01mm e uma marcação graduada de 100 quadrados, cada um com 0,1mm x 0,1mm (área total de 1mm²). Assim sendo, o volume compreendido na área de 10 quadrados após a colocação da lamínula é de 0,001mm³ ou 1 milhão por mL facilitando a leitura direta da concentração de espermatozóides na amostra (Figura 4). Tanto a concentração como a motilidade foram avaliadas em microscopia ótica com um aumento de 400 vezes e seguiram os critérios da OMS (1999).



Figura 4. Câmara de Makler e sua representação gráfica à direita. O número de espermatozoides contados em qualquer faixa de dez quadrados indica a concentração em milhões por mL. Fonte: <http://www.crh.com.br/crh.asp?pasta=33&livro=1&txt=3>

- **Motilidade:** é determinada em função do total de espermatozoides presentes. Foram contados pelo menos 100 espermatozoides agrupando-os em quatro categorias de acordo como se apresentam: tipo A (espermatozoides com progressão linear rápida), tipo B (espermatozoides com progressão linear lenta ou não), tipo C (espermatozoides móveis sem progressão) e tipo D (espermatozoides imóveis). Foram consideradas amostras com motilidade espermática normal, aquelas cuja soma de A e B era $\geq 50\%$.
- **Morfologia:** os espermatozoides foram avaliados segundo os padrões morfológicos estabelecidos pela OMS (1999), utilizando a análise microscópica em objetiva de imersão. Segundo esses critérios, é considerado normozoospermico o paciente que possui $\geq 30\%$ de formas normais dos espermatozoides. As alterações avaliadas foram: defeitos na forma e tamanho da cabeça, peça intermediária, cauda e inclusões citoplasmáticas.

- **Vitalidade:** é um parâmetro adicional que discrimina espermatozóides vivos de mortos. Segundo a OMS (1999) uma amostra de esperma é considerada normal quando existem pelo menos 50% dos espermatozóides vivos. Uma das técnicas amplamente utilizadas na avaliação deste parâmetro é o teste da eosina-nigrosina. Uma vez que a membrana plasmática intacta de um espermatozóide não é permeável à eosina, um espermatozóide que possua esta estrutura celular danificada incorpora o corante e apresenta uma coloração vermelha. A nigrosina, por sua vez, fornece o contraste necessário para a visualização de espermatozóides vivos (não corados).

4.6 Estatística

Para verificar se a distribuição amostral é normal, utilizamos o teste estatístico de Kolmogorov-Smirnov (Lilliefors) e observamos que, na sua maioria, o conjunto de dados não segue uma distribuição normal. Dessa forma, foi aplicado o teste estatístico não paramétrico qui-quadrado ou Exato de Fisher, quando necessário. Os dados obtidos dos pacientes foram computados em planilhas do Excel (Microsoft Office Excel 2010[®]). Para comparação das variáveis utilizou-se o software BioEstat[®] 5.0 (AYRES et al., 2008), com um intervalo de confiança de 95% ($\alpha = 5\%$; valor significativo de $p < 0,05$).

Considerou-se o resultado do segundo espermograma, confirmação de diagnóstico, como os dados da medida pré-intervenção. Os resultados pós-tratamento referem-se aos dados obtidos no terceiro espermograma, que foi realizado ao fim do tratamento.

5. PUBLICAÇÕES

ARTIGO 1 – ANTIOXIDANTES E INFERTILIDADE MASCULINA – REVISÃO DE LITERATURA

ARTIGO 2 – FOLIC ACID DOES NOT IMPROVE SEMEN PARAMETERS IN SUBFERTILE MEN: A RANDOMIZED DOUBLE-BLIND PLACEBO CONTROLLED TRIAL

ARTIGO 1

Antioxidantes e Infertilidade Masculina – Revisão de literatura

Antioxidants and Male Infertility - Literature review

Antioxidantes e Infertilidade Masculina

Tatiana Moreira da Silva¹; Mario Silva Approbato²; Mônica Canêdo Silva Maia³; Jalsi Tacon Arruda⁴; Fabiana Carmo Approbato⁵; Carolina Rodrigues de Mendonça⁶

1. Mestranda em Ciências da Saúde na Universidade Federal de Goiás (UFG); biomédica do Laboratório de Reprodução Humana do Hospital das Clínicas - UFG - Goiânia (GO) - Brasil.

2. Professor Titular do Departamento de Gineco-Obstetrícia da Faculdade de Medicina e da Pós-graduação em Ciências da Saúde; Diretor do Laboratório de Reprodução Humana do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás - Goiânia (GO) - Brasil.

3. Doutoranda em Ciências da Saúde na Universidade Federal de Goiás (UFG); biomédica do Laboratório de Reprodução Humana do Hospital das Clínicas - UFG - Goiânia (GO) - Brasil.

4. Doutoranda em Ciências da Saúde na Universidade Federal de Goiás (UFG) - Laboratório de Reprodução Humana do Hospital das Clínicas - Goiânia (GO) - Brasil.

5. Mestranda em Ciências da Saúde na Universidade Federal de Goiás - Laboratório de Reprodução Humana do Hospital das Clínicas - Goiânia (GO) - Brasil.

6. Mestranda em Ciências da Saúde na Universidade Federal de Goiás (UFG); especialista em Fisioterapia na Saúde da Mulher pelo Centro de Estudos Avançados e Fisioterapia Integrada (CEAF) - Goiânia (GO) - Brasil.

Instituição onde foi realizado:

Laboratório de Reprodução Humana do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás (UFG) - Goiânia (GO) - Brasil.

Endereço para correspondência

Tatiana Moreira da Silva

Hospital das Clínicas da UFG – Laboratório de Reprodução Humana

Primeira Avenida, s/nº – Setor Leste Universitário, Goiânia- GO, Brasil.

CEP: 74605-020

Telefone: (62) 3269-8378

E-mail: tatiana.more@hotmail.com

Conflito de interesses: Não há conflito de interesse.

Artigo submetido ao **JBRA Assisted Reproduction** em 23/04/2012. Aceito para publicação em 03/05/2012 (Normas de publicação – Anexo IV)

Resumo

O estresse oxidativo pode afetar negativamente a qualidade do sêmen, provocando danos e disfunção dos espermatozoides. A correção deste fator com antioxidantes é controversa e tem sido extensivamente estudada. Assim, foi realizada uma revisão da literatura com base no Pubmed buscando estudos que tiveram como objetivo melhorar a qualidade do líquido seminal através do uso de antioxidantes. Encontramos estudos que confirmaram aumento nas taxas de gravidez, produção, motilidade e contagem de espermatozoides utilizando suplementação oral e outros estudos não obtiveram resultado satisfatório. A maioria dos trabalhos utilizou associação de medicamentos neste tratamento. A associação dificulta identificar qual agente é o principal responsável pelo efeito ou mesmo se ocorre interação entre as drogas.

Palavras-Chave: Antioxidantes; Suplementos Nutricionais; Estresse Oxidativo; Infertilidade Masculina.

Abstract

Oxidative stress can adversely affect semen quality, causing damage and dysfunction of sperm. The correction of this factor with antioxidants is controversial and has been extensively studied. It was therefore carried out a literature review based on Pubmed seeking studies that were aimed at improving the quality of seminal fluid through the use of antioxidants.

We found studies that confirmed an increase in pregnancy rates, production, motility and sperm count using oral supplementation and other studies did not obtain satisfactory results. Most studies have used drugs in this combination treatment.

Key Words: *Antioxidants; Dietary Supplements; Oxidative Stress; Male Infertility.*

INTRODUÇÃO

Estimativas globais indicam que a infertilidade atinge entre 50 a 80 milhões de pessoas (WHO, 2012) e aproximadamente 8% dos homens em idade reprodutiva procuram assistência médica por problemas relacionados à fertilidade (Esteves e Agarwal, 2011). A integridade da composição do fluido seminal com seus parâmetros (motilidade, concentração, morfologia e vitalidade) é importante para a função reprodutiva (WHO, 2010). O plasma seminal humano contém antioxidantes úteis no potencial de fertilização do esperma (Atig et al., 2012). Na prática clínica, a análise do sêmen tem papel relevante na avaliação da fertilidade masculina (Esteves e Agarwal, 2011). Na literatura há uma grande variedade de fatores que afetam negativamente a qualidade do sêmen tais como o estresse oxidativo, induzido por fatores ambientais, estilo de vida e infecção, podendo prejudicar a fertilidade masculina (Esteves e Agarwal, 2011). O estresse oxidativo é uma condição associada ao aumento da taxa de dano celular induzida por espécies reativas ao oxigênio (*Reactive Oxygen Species – ROS*) que atingem os componentes celulares, incluindo lipídios, proteínas, ácidos nucleicos e açúcares (Bansal e Bilaspuri, 2010). O uso de antioxidantes no tratamento dessa condição tem relatos na literatura, com suposto efeito benéfico na produção, motilidade e contagem de espermatozoides. O objetivo desta revisão foi procurar estudos que testaram a eficácia da suplementação de antioxidantes em homens inférteis, numa tentativa de melhorar a qualidade do líquido seminal e aumentar as taxas de gravidez.

MÉTODOS

Trata-se de revisão da literatura, exploratória e retrospectiva, com foco principal na busca das referências bibliográficas nas bases de dados PubMed, Lilacs, SciELO e MEDLINE com as seguintes palavras-chave: “Antioxidantes, Suplementos Nutricionais, Infertilidade Masculina, Estresse Oxidativo” e seus termos correspondentes na língua inglesa. A busca foi realizada durante os meses de novembro de 2011 a fevereiro de 2012. Foram encontrados 180 artigos publicados entre 2006 e 2012, e 6 obtidos por meio de “referência cruzada”. Foram utilizadas neste artigo 26 referências, as quais contemplavam melhor o tema proposto. Os resumos pré-selecionados foram posteriormente lidos na versão completa.

Os critérios de inclusão foram: a) pesquisas realizadas com seres humanos; b) uso de antioxidantes em homens inférteis; c) estudos de antioxidantes que avaliaram influência positiva ou neutra na qualidade do sêmen. O critério de exclusão para a revisão foi estudos em animais.

DISCUSSÃO

Estresse oxidativo

O estresse oxidativo ocorre por resultado de desequilíbrio entre as espécies reativas de oxigênio e antioxidantes no organismo (Bansal e Bilaspuri, 2010). Quando os antioxidantes naturais do esperma não podem impedir a produção exógena de ROS da própria célula, ocorre lesão às células, causando danos aos espermatozoides (Bansal e Bilaspuri, 2010; Jensen et al., 2011), fator importante na infertilidade masculina (Figura 1).

Antioxidantes

Antioxidantes são compostos biológicos e químicos que podem reduzir o dano oxidativo (Jensen et al., 2011). Eles podem ser classificados em enzimáticos e não enzimáticos (Quadro 1). Os enzimáticos são também conhecidos como antioxidantes naturais que agem neutralizando o excesso de ROS, prevenindo danos à estrutura celular. Não enzimáticos são antioxidantes sintéticos ou suplementos alimentares (Silva et al., 2010).

No líquido seminal há antioxidantes naturais que neutralizam o estresse oxidativo e podem ser complementados pela dieta ou suplementação alimentar (Jensen et al., 2011). A justificativa para o uso de terapias alternativas pela suplementação é baseada na suposição de que podem melhorar o potencial de fertilidade masculina e a qualidade do sêmen (Ahmad et al., 2010).

Efeitos dos antioxidantes na qualidade do sêmen

Com base em evidência científica, inúmeros estudos têm avaliado o uso de antioxidantes para melhorar a qualidade do esperma e assim, a fertilidade. Estes produtos foram utilizados individualmente ou em combinação, e se diferem quanto ao tipo, à população-alvo, dose e duração da terapia (Tempest et al., 2008).

Ortiz et al. (2011) relataram recentemente que o uso de melatonina pode melhorar os parâmetros de motilidade dos espermatozoides em comparação a grupos não tratados, sugerindo melhora na produção de ATP nas mitocôndrias.

Em estudo controlado randomizado em homens com oligoastenozoospermia idiopática, Ghanem et al. (2010) demonstraram eficácia no tratamento combinado de citrato de clomifeno e vitamina E. Houve aumento da taxa de gravidez, melhora na motilidade e na contagem dos espermatozoides com resultados significativamente melhores no grupo tratado em comparação ao grupo placebo.

A suplementação com vitamina E também tem demonstrado resultados significativos na criopreservação de espermatozoides em pacientes inférteis com normozoospermia e astenozoospermia. Observaram melhora da motilidade espermática e na manutenção da integridade do DNA pós-descongelamento (Kalthur et al., 2011).

Pacientes com astenozoospermia foram divididos em dois grupos; o primeiro tratado com L-carnitina e vitamina E, e o segundo grupo somente com vitamina E. Após o tratamento, a taxa de gravidez foi significativamente maior no primeiro grupo (31,1%) do que no segundo grupo (3,8%) e nenhum evento adverso foi encontrado durante o tratamento (Wang et al., 2010).

Homens inférteis foram tratados durante três meses, pela combinação de L-carnitina, L-arginina, zinco, vitamina E, glutatona, selênio, co-enzima Q10 e ácido fólico. Os resultados indicaram aumento significativo do volume ejaculatório, concentração de espermatozoides, motilidade (progressiva e total) e da percentagem de morfologia normal, em comparação ao grupo controle. Não foram encontrados efeitos adversos e 34 gestações foram relatadas após seis meses de tratamento (Imhof et al., 2011).

Durante três meses, homens inférteis foram tratados com *Withania somnifera*, conhecida como Ginseng indiano, e após o tratamento a concentração e volume seminal aumentou significativamente em homens com normozoospermia e oligozoospermia, mas não investigaram as taxas de gravidez após o tratamento (Ahmad et al., 2010).

Homens com fator de infertilidade masculina severa foram incluídos em um estudo randomizado, duplo-cego utilizando suplementação oral com antioxidante. Uma combinação de vitamina C, zinco, vitamina E, ácido fólico, selênio e óleo de alho foram utilizados. Houve melhora significativa na taxa de gravidez viável (38,5% dos embriões

transferidos), em comparação ao grupo controle (16% de gravidez) [Tremellen et al., 2007].

Empregando-se a mesma combinação de antioxidantes do estudo anterior, administrado uma vez ao dia durante três meses, resultou em melhorias significativas na integridade do DNA de espermatozóides, acompanhada por uma redução na produção de ROS seminal e apoptose. Não ocorreram alterações significativas na concentração, motilidade e morfologia (Tunc et al., 2009).

Melhores taxas de gravidez foram registradas, após suplementação pelos parceiros, com dieta rica em beta-caroteno, vitamina C, vitamina E e zinco durante 3 meses, em casais com história de perda de embriões recorrente (Gil-Villa et al., 2009).

Estudo randomizado em pacientes com astenozoospermia usando terapia exclusiva de zinco e em combinação com antioxidantes naturais como vitaminas C e E mostrou melhora importante na qualidade dos espermatozóides com aumento da motilidade e na integridade da membrana do gameta (Omu et al., 2008).

Em estudo duplo cego, placebo controlado, Ebisch et al. (2006) encontraram aumento de espermatozóides após tratamento diário com ácido fólico (5 mg/dia) e sulfato de zinco (66mg/dia). Os resultados indicaram aumento da concentração de espermatozóides em homens inférteis sem relação com alterações nos níveis de testosterona, FSH ou concentrações de inibina B.

Outro estudo randomizado, duplo cego, placebo controlado, administrou pentofixifilina via oral, em homens inférteis e observou melhora na concentração e motilidade dos espermatozóides, porém, não avaliou as taxas de gravidez (Safarinejad, 2011A).

Homens inférteis com oligoastenoteratozoospermia idiopática usaram suplementação com ácidos graxos ômega-3 por 32 semanas, e observou-se incremento na qualidade do sêmen em comparação ao grupo placebo, porém sem abordar taxas de gravidez no grupo tratado (Safarinejad, 2011B).

Pacientes com infertilidade idiopática foram tratados com antioxidantes lipofílicos e Coenzima Q10 em estudo randomizado placebo controlado. Nesta terapia houve aumento da taxa de gravidez, do volume de plasma seminal e da motilidade dos espermatozóides (Balercia et al., 2009).

Por outro lado, nenhum impacto significativo sobre gravidez espontânea foi encontrado após terapia incluindo vários antioxidantes (vitamina A, vitamina C, vitamina E, N-acetilcisteína, zinco, tiamina, riboxavin, piridoxina, nicotinamida, pantotenato, biotina, cianocobalamina, ergocalciferol, cálcio, magnésio, fosfato, ferro, manganês e cobre), mas se mostrou eficaz na melhora da contagem de espermatozóides (Paradiso Galatioto et al., 2008).

Por outro lado Safarinejad e Safarinejad (2009) encontraram melhora nos parâmetros seminais, sem efeitos colaterais, em um estudo randomizado, duplo-cego, placebo controlado, ao utilizar suplementação oral com selênio e N-acetilcisteína em homens com oligoastenoteratozoospermia idiopática.

O açafraão (*Crocus sativus*) administrado em homens com infertilidade idiopática pode apresentar efeito positivo na morfologia e motilidade dos espermatozóides, sem aumento no número dessas células (Heidary et al., 2008).

Ao contrário do trabalho anterior, Safarinejad et al. (2011) em estudo randomizado placebo controlado com esta mesma raiz, não encontraram melhora significativa nos parâmetros seminais. Houve queda significativa dos leucócitos e células vermelhas do sangue periférico. Desta forma esses autores alertam para o uso potencialmente perigoso se for prolongado e em altas doses.

Em 2002 foi realizado um estudo duplo-cego, randomizado, controlado, avaliando a suplementação de zinco (66 mg/dia) e ácido fólico (5 mg/dia) em homens férteis e

subférteis. Homens subférteis demonstraram um aumento significativo de 74% na contagem total de espermatozóides normais e um pequeno aumento de 4% de espermatozóides anormais, sem referir qual parâmetro. No entanto, não foi estabelecido se a melhora na concentração espermática observada após a administração de ácido fólico e zinco poderia aumentar a probabilidade de alcançar gravidez (Wong et al., 2002).

Considerações finais

Avaliamos os relatos da literatura sobre tratamento antioxidante para homens inférteis com intuito de melhorar a função do esperma e aumentar as taxas de gravidez. Alguns trabalhos relatam aumento na produção e motilidade de espermatozóides, além de melhoras na taxa de gravidez. Outros não obtiveram o mesmo sucesso. Ensaio clínicos randomizados definindo melhor os parâmetros avaliados, dose ideal de antioxidantes e prováveis efeitos adversos como danos ao DNA espermático ou ao embrião em desenvolvimento são necessários. A heterogeneidade dos parâmetros avaliados dificulta a comparação dos trabalhos ocasionando falta de padronização dos tratamentos. Entretanto, a investigação minuciosa da infertilidade pode contribuir no sucesso da gravidez.

REFERÊNCIAS

- Ahmad MK, Mahdi AA, Shukla KK, Islam N, Rajender S, Madhukar D, et al. *Withania somnifera* improves semen quality by regulating reproductive hormone levels and oxidative stress in seminal plasma of infertile males. *Fertil Steril*. 2010;94:989-96.
- Atig F, Raffa M, Ali HB, Abdelhamid K, Saad A, Ajina M. Altered antioxidant status and increased lipid per-oxidation in seminal plasma of Tunisian infertile men. *Int J Biol Sci*. 2012;8:139-49.
- Balercia G, Buldreghini E, Vignini A, Tiano L, Paggi F, Amoroso S, et al. Coenzyme Q10 treatment in infertile men with idiopathic asthenozoospermia: a placebo-controlled, double-blind randomized trial. *Fertil Steril*. 2009;91:1785-92.
- Bansal AK, Bilaspuri GS. Impacts of oxidative stress and antioxidants on semen functions. *Vet Med Int*. 2010;1-7.
- Ebisch IM, Pierik FH, DE Jong FH, Thomas CM, Steegers-Theunissen RP. Does folic acid and zinc sulphate intervention affect endocrine parameters and sperm characteristics in men? *Int J Androl*. 2006;29:339-45.
- Esteves SC, Agarwal A. Novel concepts in male infertility. *Int Braz J Urol*. 2011;37:5-15.
- Ghanem H, Shaer O, El-Segini A. Combination clomiphene citrate and antioxidant therapy for idiopathic male infertility: a randomized controlled trial. *Fertil Steril*. 2010;93:2232-5.
- Gil-Villa AM, Cardona-Maya W, Agarwal A, Sharma R, Cadavid A. Role of male factor in early recurrent embryo loss: do antioxidants have any effect? *Fertil Steril*. 2009;92:565-71.
- Heidary M, Vahhabi S, Reza Nejadi J, Delfan B, Birjandi M, Kaviani H, Givrad S. Effect of saffron on semen parameters of infertile men. *Urol J*. 2008;5:255-9.
- Imhof M, Lackner J, Lipovac M, Chedraui P, Riedl C. Micronutrient supplementation increases sperm quality in the sub-fertile male. *Europ Urol Rev*. 2011;6:120-23.
- Jensen TK, Skakkebaek NE, Jørgensen N, Jensen MB, Juul A. Antioxidants and male subfertility--a survey of a Cochrane review. *Ugeskr Laeger*. 2011;173:3253-5.

Kalthur G, Raj S, Thiyagarajan A, Kumar S, Kumar P, Adiga SK. Vitamin E supplementation in semen-freezing medium improves the motility and protects sperm from freeze-thaw-induced DNA damage. *Fertil Steril*. 2011;95:1149-51.

Omu AE, Al-Azemi MK, Kehinde EO, Anim JT, Oriowo MA, Mathew TC. Indications of the mechanisms involved in improved sperm parameters by zinc therapy. *Med Princ Pract*. 2008;17:108-16.

Ortiz A, Espino J, Bejarano I, Lozano GM, Monllor F, García JF, et al. High endogenous melatonin concentrations enhance sperm quality and short-term *in vitro* exposure to melatonin improves aspects of sperm motility. *J Pineal Res*. 2011;50:132-9.

Paradiso Galatioto G, Gravina GL, Angelozzi G, Sacchetti A, Innominato PF, Pace G, et al. May antioxidant therapy improve sperm parameters of men with persistent oligospermia after retrograde embolization for varicocele? *World J Urol*. 2008;26:97-102.

Safarinejad MR, Safarinejad S. Efficacy of selenium and/or N-acetyl-cysteine for improving semen parameters in infertile men: a double-blind, placebo controlled, randomized study. *J Urol*. 2009;181:741-51.

Safarinejad MR, Shafiei N, Safarinejad S. A prospective double-blind randomized placebo-controlled study of the effect of saffron (*Crocus sativus* Linn.) on semen parameters and seminal plasma antioxidant capacity in infertile men with idiopathic oligoasthenoteratozoospermia. *Phytother Res*. 2011;25:508-16.

Safarinejad MR. Effect of pentoxifylline on semen parameters, reproductive hormones, and seminal plasma antioxidant capacity in men with idiopathic infertility: a randomized double-blind placebo-controlled study. *Int Urol Nephrol*. 2011;43:315-28.

(A)

Safarinejad MR. Effect of omega-3 polyunsaturated fatty acid supplementation on semen profile and enzymatic anti-oxidant capacity of seminal plasma in infertile men with idiopathic oligoasthenoteratospermia: a double-blind, placebo-controlled, randomised study. *Andrologia*. 2011;43:38-47. (B)

Silva FM, Marques A, Chaveiro A. Reactive oxygen species: a double-edged sword in reproduction. *Open Vet Sci J*. 2010;4:127-33.

Tempest HG, Homa ST, Routledge EJ, Garner A, Zhai XP, Griffin DK. Plants used in Chinese medicine for the treatment of male infertility possess antioxidant and anti-oestrogenic activity. *Syst Biol Reprod Med*. 2008;54:185-95.

Tremellen K, Miari G, Froiland D, Thompson J. A randomised control trial examining the effect of an antioxidant (Menevit) on pregnancy outcome during IVF-ICSI treatment. *Aust N Z J Obstet Gynaecol*. 2007;47:216-21.

Tunc O, Thompson J, Tremellen K. Improvement in sperm DNA quality using an oral antioxidant therapy. *Reprod Biomed Online*. 2009;18:761-68.

Wang YX, Yang SW, Qu CB, Huo HX, Li W, Li JD, et al. L-carnitine: safe and effective for asthenozoospermia. *Zhonghua Nan Ke Xue*. 2010;16:420-22.

WHO - World Health Organization, Department of Reproductive Health and Research. Laboratory manual for the examination and processing of human semen. Fifth ed. 2010.

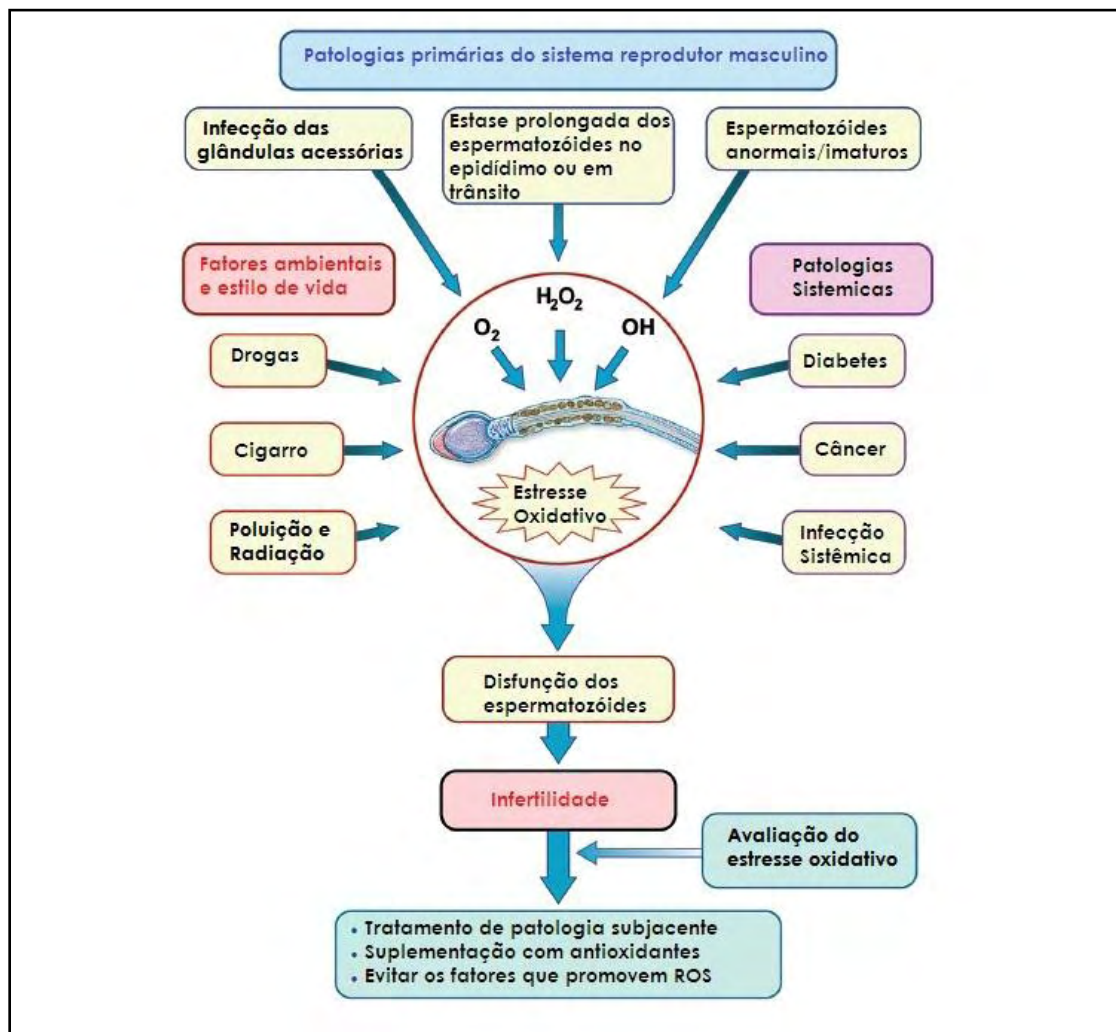
WHO - World Health Organization. Genomic resource centre: Assisted Reproductive Technologies (ARTs). In: WHO. Infertility: a tabulation of available data on prevalence of primary and secondary infertility. WHO: Geneva. Programme on Maternal and Child Health and Family Planning, Division of Family Health. 1991. Acesso em: 09 de março de 2012. Disponível em: <http://www.who.int/genomics/gender/en/index6.html>

Wong WY, Merkus HM, Thomas CM, Menkveld R, Zielhuis GA, Steegers-Theunissen RP. Effects of folic acid and zinc sulfate on male factor subfertility: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *Fertil Steril*. 2002;77:491-98.

Quadro 1. Principais agentes de defesa antioxidantes.

Antioxidantes Enzimáticos	Antioxidantes Não-Enzimáticos
Superóxido dismutase Catalase NADPH-quinona oxidoreductase Glutathione peroxidase Glutathione transferase Enzimas de reparo	Melatonina (produzida pelo organismo) Ácido ascórbico – vitamina C Alfa-tocoferol – vitamina E Beta-caroteno – vitamina A Ácido fólico Selênio Cobre Zinco Magnésio Fosfato Flavonóides Proteínas do plasma N-acetilcisteína Glutathione Clorofilina L-cisteína L-carnitina Curcumina Pentoxifilina Coenzima Q10 Ômega-3

Figura 1. Patologias primárias do sistema reprodutor masculino, estresse oxidativo e infertilidade masculina (Modificada de Esteves e Agarwal, 2011).



ARTIGO 2

Submetido a Reproductive Biomedicine Online em 04/07/2012.

Folic acid does not improve semen parameters in subfertile men: a randomized double-blind placebo controlled trial

Tatiana Moreira da Silva^{1,*}, Mônica Canêdo Silva Maia¹, Jalsi Tacon Arruda^{1,2}, Fabiana Carmo Approbato¹, Carolina Rodrigues Mendonça¹, Mário Silva Approbato¹

¹ Graduate Program in Health Sciences, School of Medicine, Universidade Federal de Goiás

² J.T. Arruda is recipient of a Doctoral Fellowship from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)

Laboratory of Human Reproduction, Clinical Hospital of Universidade Federal de Goiás (UFG), Goiânia, Goiás, Brazil

* Corresponding Author

Email: tatiana.more@hotmail.com

Phone number: 55 (62) 3269-8278

Postal Address: 1ª Avenida, s/nº, Setor Universitário, CEP: 74605-020, Goiânia-GO, Brazil.

ABSTRACT

It is thought that oral supplementation with antioxidants might reduce damage caused by reactive oxygen species in the seminal fluid, and as a consequence it increases the fertilizing capacity of spermatozoa due to improvement of sperm parameters. The aim of this research is to evaluate the effect of folic acid supplementation, by semen analysis, in 49 subfertile men with the median age being 35.3 years (± 7.7). The experimental group (n= 23) received 5mg of folic acid daily and the control group (n= 26) received placebo, both groups were treated for three months. In order to confirm the condition of subfertility, two sperms analysis were performed with an interval of 15 days between the first and the second test. Moreover, sexual intercourse and masturbation abstinence were required for two to five days before collecting the semen samples. Pre and post-intervention examination was performed in the same laboratory by two professionals, according to the WHO criteria, 1999. The chi-square test was applied for both groups. According to the results there was no statistically significant improvement in any of the following parameters: concentration, motility, morphology and vitality of the spermatozoa. We concluded that folic acid treatment alone in doses of 5mg/day does not improve sperm parameters in subfertile men.

Keywords: male infertility; antioxidant supplements; folic acid, sperm analysis; oxidative stress.

Conflict of interest: Tatiana Moreira da Silva, Mônica Canêdo Silva Maia, Jalsi Tacon Arruda, Fabiana Carmo Approbato, Carolina Rodrigues de Mendonça e Mário Silva Approbato claim that there is not any conflict of interest.

INTRODUCTION

The number of couples at reproductive age with infertility problems is increasing each day and it is estimated that 15% of those couple have difficulty getting pregnant. The male factor infertility accounts for up to half of all cases (Wong, 2000; Dohle et al., 2007; Pasqualotto, 2007; Showell et al., 2009; Hamada et al., 2011). Semen analysis evaluates the quality of semen in a variety of parameters. Nevertheless, there is not an apparent cause for the large number of andrologic disorders, a condition that is named idiopathic male infertility which is mainly related to changes in the lifestyle, environmental exposure and eating habits (Hirsh, 2003; Isidori et al., 2006; Mendiola et al., 2009; Hamada et al., 2011). Tremellen (2008) stated that one in twenty men in the general population will be subfertile.

Some researches show that spermatogenic changes might be caused by the presence of high levels of Reactive Oxygen Species (ROS) which can lead to cell damage (Martin-Du Pan et al., 1998; Rolf et al., 1999; Alvarez, 2003; Greco et al., 2005; Agarwal et al., 2006abc; Ebisch et al., 2006; Young et al., 2008; Mendiola et al., 2009; Hamada et al., 2011). It is suggested that ROS produced by leukocytes and spermatozoa are responsible for sperm damage and this contributes to the pathology in 30 to 80% of infertility cases (Martin-Du Pan et al., 1998; Esteves e Agarwal, 2011).

It is thought that oral supplementation with antioxidants could reduce this kind of damage and it could also increase the fertilizing capacity of spermatozoa due to improvement of sperm parameters.

The most commonly used antioxidants are vitamin E, vitamin C, carotenoids, ubiquinol and the micronutrients folate and zinc (Agarwal et al., 2004; Eskenazi, 2005; Showell, 2009). There are some researches that report an improvement in semen parameters suggesting that the antioxidants used alone or combined with vitamins and micronutrients, minimize the toxic effects of oxidative stress in spermatozoa (Fraga et al., 1991; Agarwal et al., 2002, 2005). However, the combination of drugs makes it difficult to identify which component could have a beneficial effect on the semen parameters. Due to the controversy about the different effects of these substances and because many authors use a combination of them, the present work evaluated the effect of oral supplementation with folic acid alone in the quality of the sperm from subfertile men.

MATERIALS AND METHODS

Patients

A randomized clinical trial was performed in the Human Reproduction Laboratory of the Clinical Hospital of Federal University of Goiás (LabRep/HC-UFG). This essay is a double-blind and a placebo-controlled study between 2009 and 2011. The study was approved by the Ethics Committee of the UFG Clinical Hospital (CEP/HC-UFG n° 050/2009).

The study participants were assessed twice before recruitment. Different sperm analysis was performed twice with an interval of 15 days between the first and the second test. Sexual intercourse and masturbation abstinence were required for two to five days before collecting the semen samples, which is according to the WHO recommendations (1999). We included in the study men who did not take any additional supplement or vitamin along with the supplement provided, and men who did not change eating habits during their period of assessment.

Patients who had abnormal results after the second semen analysis were selected. The subfertility was characterized by conditions such as: oligozoospermic, astenozoospermic, teratozoospermic or even the combination of two or three of such conditions. Patients with high FSH levels, hypergonadotropic hypogonadism, azoospermic and patients treated with clomiphene citrate were excluded. We collected data related to alcoholic beverage consumption and smoking habit, and these data were used in order to compare the studied groups.

Clinical study design

Patients were randomized into two groups. The patients in the experimental group received 5 mg of folic acid a day and the control group received placebo, during a period of three months. After they took the medication and after the abstinence period, the patients were instructed to collect a third sample of semen.

Statistical Analysis

The results were expressed as average and standard deviation (\pm SD). For statistical significance tests we used the chi-square test or Fisher's Exact whenever necessary. In order to compare the variables used BioEstat[®] 5.0 (Ayres et al., 2008), with a confidence interval of 95% ($\alpha= 5\%$; significant p value < 0.05).

RESULTS

At first, 80 patients were selected because they met all the inclusion criteria. However, 31 patients were excluded because of different reasons such as: problems in the administration of drugs to patients (n=07), patients who were not present at the day of the examination skipping the appointment for four times (n=10), patients who refused to take part in the research (n=09), spontaneous pregnancy (n=01) or unknown causes (n=04). Therefore, 49 patients carried out the study protocol successfully.

Table 1 describes groups before the folic acid or placebo intervention and it shows certain homogeneity between the groups. Their ages ranged between 23 to 56 years, and the average was 35.3 years (± 7.7).

The effects of treatment were assessed by the performance of the sperm analysis after the intervention, and it was analyzed the concentration, motility, morphology and vitality of the spermatozoa.

Before the intervention, the average sperm concentration in millions/ml (Figure 1) in the experimental group was 25.91 (± 24.09) and after the treatment it was 26.08 (± 24.52). In the control group, the results for that same parameter were 20.85 (± 19.69) before intervention and 20.04 (± 16.35) after the intervention. The difference found was not statistically significant (p=0.92).

Regarding sperm motility, the averages of progressive motile sperm (Figure 2) for the experimental and placebo groups before the treatment were respectively 46.48% (± 14.87) and 49.23% (± 13.47). After the acid folic treatment, the average found in the experimental group was 48.26% (± 10.72) and in the control group the average found was 49.65% (± 11.93) [p=0.99].

The average normal spermatozoa morphology (Figure 3) was 23.26% (± 2.86) before the treatment in the experimental group and after the intervention it as 23.91% (± 3.68). The average found in the control group was 22.3% (± 3.53) and 24.23% (± 3.06), respectively (p= 0.83).

The average found in the treated group for the spermatozoa vitality (Figure 4) was 66.73% (± 8.73) before the treatment and 69.56% (± 7.96) after the acid folic treatment.

For the control group the average was 65.77% (± 9.45) before the treatment and 65.38% (± 12.64) after the placebo treatment. The difference found was not statistically significant ($p = 0.95$).

The analysis of the sperm parameters showed no significant differences between treatment and control groups (table 2).

When we analyze the life style of the patients in both groups we don't find any significant differences when we compare the alcoholic beverage consumption habit to the lack of improvement in the diagnosis of the sperm analysis ($p = 0.18$ for the experimental group and $p = 0.60$ for the control group). The same is true for the smoking habit ($p = 0.17$ for the experimental group and $p = 0.72$ for the control group).

DISCUSSION

The results of the present work show that treatment with folic acid in a dose of 5mg/day did not improve the main semen parameters in a significant way, as well as Rolf et al., 1999; Comhaire et al., 2000; Lenzi et al., 2004, Greco et al., 2005a; Sigman et al., 2006; Tunc et al., 2009; Safarinejad et al., 2011 who also tested the efficacy of oral antioxidant treatment either associated with other components or not. On the other hand, different researches found statistically significant results (Keskes-Amar et al., 2003; Wong et al., 2002; Comhaire et al., 2005; Ebisch et al. 2006; Tremellen et al., 2007; Paradiso Galatioto et al., 2008; Piombini et al., 2008; Omu et al., 2008; Barbosa, 2009; Hawkes et al., 2009 e Ghanem et al. 2010).

The sample size of this study is similar to the sample of the following authors: Keskes-Amar et al. (2003), Comhaire et al. (2005), Tremellen et al. (2007), Paradiso Galatioto et al. (2008), Piombini et al. (2008), Omu et al. (2008), Barbosa (2009), Tunc et al. (2009), Hawkes et al. (2009) e Ghanem et al. (2010) who studied respectively, 48, 30, 52, 42, 51, 45, 30, 50, 44 and 60 cases.

There was a slight increase in the concentration of spermatozoa with a difference of 13.2% when compared to the control group, and this was also observed about the spermatozoa motility. Although these data are not statistically significant they are consistent with data reported by Barbosa (2009) who tested infertile Portuguese patients. In Brazil, the variation of race-ethnicity and characteristics of the region where the study took place could to influence by the fact that our population is miscegenated. This study was the first to examine subfertile men in the center west of Brazil and supplementation oral with folic acid.

The choice of the micronutrient folic acid is justified because it is largely used, including in pregnant women in order to reduce the risk of neural tube defects (Tamura e Picciano, 2006), and it also has low incidence of side effects. There is scientific evidence for the antioxidant activity of the folic acid in a 5mg/day dose, associated with Zinc for the treatment of subfertile men, and there were results showing beneficial effects (Wong et al., 2002; Ebisch et al., 2006) or neutral effects (Ramasamy, 2012).

Despite being water-soluble, the folic acid inhibits lipid peroxidation in order to protect cell membrane and DNA from damage caused by free radicals (Ebisch et al., 2007). Folic acid is an essential vitamin important for cell proliferation, it works as a cofactor of enzymes involved in purine and pyrimidine synthesis, therefore being essential for DNA synthesis in spermatogenesis (Wong et al., 2002; Agarwal et al., 2008ab; Forges et al., 2008).

Systematic review of published data from Cochrane (2011) stated that the combined supplementation have shown increased fertilization rates of couples undergoing assisted reproductive technologies. The study included 34 studies in a total of 2876 couples and

they concluded that the antioxidant use by the male partner was associated with a statistically significant increased pregnancy rate and live birth rate compared to control. However, this meta-analysis has neither identified the specific agents nor the optimal dosage for the treatment of infertile men.

Wong et al., 2000; Ebisch et al., 2006; Tremellen et al., 2007; Ghanem et al., 2010 and Imhof et al., 2011, among others, used combinations of antioxidants. Although these drugs are combined in most studies it is important to develop more research about these interactions. These facts, as well as varying the dose interval make it difficult to standardize the therapy once one cannot identify the real active component.

Hence this study performed an evaluation of the folic acid effect alone. There are only few studies which used only one substance, Omu et al. studied the effects of Zinc, 2008; Hawkes et al. studied the effects of Selenium, 2009 and Safarinejad, analyzed the effects of Omega-3, 2011. Significant improvement in semen parameters were shown only in those who used Zinc or Omega 3.

We did not find in the last ten years any study about the benefits of the exclusive use of folic acid related to the improvement of spermatozoa. Landau et al. (1978), used a supplemental dose of 10mg/day for 30 days and observed as a result that the levels of this micronutrient increased in the blood and in the seminal fluid but it did not affect the sperm count, the sperm motility or the sperm DNA. It is important noting that this studied was not either randomized or placebo-controlled.

Piombini et al. (2008), observed a statistically significant improvement in sperm motility and morphology, they used natural antioxidant compounds (beta glucan, papaya, lactotransferrin, and the vitamins C and E), this study was neither randomized nor placebo-controlled which make the positive effects they found less reliable.

Another aspect that should be analyzed is the common use of small samples and the population variation in males, from fertile men to several different levels of infertility, making it even more difficult to compare the studies.

Because of the variety of elements antioxidants evaluated, designing an ideal compound will be a challenge. Particular attention should be given to dosages and the number of ingredients used in order to develop optimized combinations. High doses of antioxidants should be avoided due to specific reactions which could lead to negative effects. High doses of vitamin A might have embryotoxic or teratogenic effects. High doses vitamin C can induce DNA damage (Ménézo et al., 2007). Selenium in high doses reduces the number of spermatozoa significantly in fertile males because it can lead to changes in the metabolism of thyroid hormones (Hawkes e Turek, 2001). Dosages of vitamin E less than 3200 mg/day and dosages of vitamin C less than 4000mg/day are considered safe (Rolf et al., 1999).

On the other hand, lower doses and a combination of substances can result in beneficial effects. Greco et al. (2005a) randomized 64 infertile men with more than 15% of sperm DNA fragmentation. They were divided in two groups, one group received vitamins C and E (1g/day each vitamin) and the other group was a placebo-controlled, they took the vitamins for two months. Although they did not notice any difference in the semen parameters the patients who received the antioxidants showed significant lower DNA fragmentation after the treatment. A further study from the same group showed that the vitamins C and E supplementation increased the rates of implantation and clinical pregnancy significantly for patients undergoing ICSI.

Taking the etiology of male infertility into account, Kefer et al. (2009), Gharagozloo and Aitken (2011) state that free radicals might induce cell damage in the semen by some different means and they can affect significantly both the quality and the seminal viability. The scarcity of cytoplasm in spermatozoa reduces their ability to retain

adequate amounts of molecules that could protect the cell from reactive oxygen species strike (Agarwal et al., 2006).

In this way, the oxidative stress evaluation is extremely important. The determination of ROS levels in semen and the establishment of reference values may be useful in order to elaborate a treatment plan. Nowadays the male infertility investigation does not give any importance to the estimation of oxidative stress because of the excessive cost and the lack of standardized measures, but it has been described more than 30 direct or indirect tests (Kefer et al., 2009).

Agarwal et al. (2005), they stated that the determination ROS levels in the seminal fluid would be helpful in order to predict the outcomes in IVF procedure, because they were related to the fertilization rates. The Intracytoplasmic Sperm Injection (ICSI) was developed to treat the male factor in the couple infertility. As a consequence, the conventional treatment of male infertility has become obsolete for some cases (Comhaire et al., 2003).

Isidori et al. (2006), Mendiola et al. (2009) e Hamada et al. (2011) associated lifestyle such as feeding, smoking and alcohol drinking to idiopathic male infertility. Esteves e Agarwal (2011), claim that smoking may induce oxidative stress once it decreases the levels of antioxidants in the seminal plasma. No significant difference was found between the habit of smoking or alcohol consumption and the lack of improvement in the semen parameters. Further researches that also consider the occupational and environmental exposures are necessary in order to clarify these aspects.

There are few scientific benefits in the adoption of preventive measures and also in the elucidation of underlying causes of male infertility (Pasqualotto et al., 2003). Most of the treatment strategies have been established in order to apply the assisted reproduction techniques. These measures have made it possible for sub-fertile couples to conceive but they are restricted only to treat the infertility symptoms (Ebisch et al., 2007).

The findings in the scientific literature are contradictory and further studies are essential for a better understanding of the mechanisms involved in oxidative stress of the ejaculate. This will enable new diagnostic and treatment systems to be developed in order to prevent free radicals cause damage to the spermatozoa. Researches must be designed so that the factors involved are controlled. This way the results can be interpreted and the controversies related to this topic will be clarified.

References

- Agarwal, A., Saleh, R.A., 2002. Role of oxidants in male infertility: rationale, significance, and treatment. *Urol. Clin. North Am.* 29, 817-827.
- Agarwal, A., Nallella, K.P., Allamaneni, S.S., Said, T.M., 2004. Role of antioxidants in treatment of male infertility: an overview of the literature. *Reprod BioMed Online*, 8, 616-627.
- Agarwal, A., Prabakaran, S.A., Said, T.M., 2005. Prevention of oxidative stress injury to sperm. *J. Androl.* 26, 654-660.
- Agarwal, A., Gupta, S., Sikka, S., 2006a. The role of free radicals and antioxidants in reproduction. *Obstet. Gynecol.* 18, 325-332.
- Agarwal, A., Prabakaran, S.A., Allamaneni, S.S., 2006b. Relationship between oxidative stress, varicocele and infertility: a meta-analysis. *Reprod Biomed. Online.* 12, 630-633.
- Agarwal, A., Sharma, R.K., Nallella, K.P., Thomas, A.J.Jr, Alvarez, J.G., Sikka, S.C., 2006c. Reactive oxygen species as an independent marker of male factor infertility. *Fertil. Steril.* 86, 878-885.
- Agarwal, A., Makker, K., Sharma, R., 2008a. Clinical relevance of oxidative stress in male factor infertility: an update. *Am. J. Reprod. Immunol.* 59, 2-11.
- Agarwal, A., Cocuzza, M., Abdelrazik, H., Sharma, R.K., 2008b. Oxidative stress measurement in patients with male or female factor infertility. *Handbook of Chemiluminescent Methods in Oxidative Stress Assessment*, 195-218.
- Alvarez, J.G. 2003. Nurture vs Nature: How can we optimize sperm quality? *J. Androl.* 24, 640-648.
- Ayres, M., Ayres-Jr, M., Ayres, D.L., Santos, A.A.S., 2007. *Bioestat: aplicações estatísticas nas áreas das Ciências Biomédicas. Versão 5.0.* Belém, Pará: Sociedade Civil Mamirauá, MCT-CNPq, 324 p. Available at: < <http://www.mamiraua.org.br>>. Accessed: March 05, 2012.
- Barbosa, F.F.S. 2009. *Influência dos antioxidantes na qualidade do sémen de homens em tratamento de fertilidade (Master's Degree).* Universidade de Lisboa, Faculdade de Ciências, Lisboa. Available in: <<http://hdl.handle.net/10451/1433>> Access: December, 20, 2011.
- Comhaire, F.H., Christophe, A.B., Zalata, A.A., Dhooge, W.S., Mahmoud, A.M., Depuydt, C.E., 2000. The effects of combined conventional treatment, oral antioxidants and essential fatty acids on sperm biology in subfertile men. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids.* 63, 159-165.
- Comhaire, F.H., El Garem, Y., Mahmoud, A., Eertmans, F., Schoonjans, F. 2005. Combined conventional/antioxidant "Astaxanthin" treatment for male infertility: a double blind, randomized trial. *Asian J. Androl.* 7, 257-262.
- Comhaire, F.H., Mahmoud, A., 2003. The role of food supplements in the treatment of the infertile man. *Reprod. Biomed. Online.* 7, 385-391.
- Ebisch, I.M., Pierik, F.H., DE Jong, F.H., Thomas, C.M., Steegers-Theunissen, R.P., 2006. Does folic acid and zinc sulphate intervention affect endocrine parameters and sperm characteristics in men? *Int. J. Androl.* 29, 339-345.
- Ebisch, I.M., Thomas, C.M., Peters, W.H., Braat, D.D., Steegers-Theunissen, R.P., 2007. The importance of folate, zinc and antioxidants in the pathogenesis and prevention of subfertility. *Hum. Reprod. Update.* 13, 163-174.
- Eskenazi, B., Kidd, S.A., Marks, A.R., Slotter, E., Block, G., Wyrobek, A.J. 2005. Antioxidant intake is associated with semen quality in health men. *Hum. Reprod.* 20, 1006-1012.

- Esteves, S.C., Agarwal, A. 2011. Novel concepts in male infertility. *Int. Braz. J. Urol.* 37, 5-15.
- Forges, T., Pellanda, H., Diligent, C., Monnier, P., Guéant, J.L., 2008. Les folates: quel impact sur la fertilité? *Gynecol. Obstet. Fertil.* 36, 930-939.
- Fraga, C.G., Motchnik, P.A., Shigenaga, M.K., Helbock, H.J., Jacob, R.A., Ames, B.N. 1991. Ascorbic acid protects against endogenous oxidative DNA damage in human sperm. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 88, 11003-11006.
- Ghanem, H., Shaeer, O., El-Segini, A., 2010. Combination clomiphene citrate and antioxidant therapy for idiopathic male infertility: a randomized controlled trial. *Fertil. Steril.* 93, 2232-2235.
- Gharagozloo, P., Aitken, R.J., 2011. The role of sperm oxidative stress in male infertility and the significance of oral antioxidant therapy. *Hum. Reprod.* 26, 1628-1640.
- Greco, E., Iacobelli, M., Rienzi, L., Ubaldi, F., Ferrero, S., Tesarik, J., 2005a. Reduction of the incidence of sperm DNA fragmentation by oral antioxidant treatment. *J. Androl.* 26, 349-353.
- Greco, E., Romano, S., Iacobelli, M., et al., 2005b. ICSI in cases of sperm DNA damage: beneficial effect of oral antioxidant treatment. *Hum. Reprod.* 20, 2590-2594.
- Hamada, A., Esteves, S.C., Agarwal, A., 2011. Unexplained male infertility: potential causes and management. *Hum. Androl.* 1, 2-16.
- Hawkes, W.C., Alkan, Z., Wong, K., 2009. Selenium supplementation does not affect testicular selenium status or semen quality in North American men. *J. Androl.* 30, 525-533.
- Hawkes, W.C., Turek, P.J., 2001. Effects of dietary selenium on sperm motility in healthy men. *J. Androl.* 22, 764-772.
- Hirsh, A., 2003. Male Subfertility. *BMJ.* 327, 669-672.
- Imhof, M., Lackner, J., Lipovac, M., Chedraui, P., Riedl, C., 2011. Micronutrient supplementation increases sperm quality in the sub-fertile male. *Eur. Urol.* 6, 120-123.
- Isidori, A.M., Pozza, C., Gianfrilli, D., Isidori, A., 2006. Medical treatment to improve sperm quality. *Reprod. Biomed. Online.* 12, 704-714.
- Kefer, J.C., Agarwal, A., Sabanegh, E. 2009. Role of antioxidants in the treatment of male infertility. *Int. J. Urol.* 16, 449-457.
- Keskes-Ammar, L., Feki-Chakroun, N., Rebai, T., et al., 2003. Sperm oxidative stress and the effect of an oral vitamin E and selenium supplement on semen quality in infertile men. *Arch. Androl.* 49, 83-94.
- Landau, B., Singer, R., Klein, T., Segenreich, E., 1978. Folic acid levels in blood and seminal plasma of normo- and oligospermic patients prior and following folic acid treatment. *Experientia.* 34, 1301-1302.
- Lenzi, A., Sgrò, P., Salacone, P., et al., 2004. A placebo-controlled double-blind randomized trial of the combined l-carnitine and l-acetyl-carnitine treatment in men with asthenozoospermia. *Fertil. Steril.* 81, 1578-1584.
- Martin-Du Pan, R.C., Sakkas, D., 1998. Is antioxidant therapy a promising strategy to improve human reproduction? Are anti-oxidants useful in the treatment of male infertility? *Hum. Reprod.* 13, 2984-2985.
- Mendiola, J., Torres-Cantero, A.M., Agarwal, A., 2009. Lifestyle factors and male infertility: an evidence-based review. *Arch. Med. Sci.* 5, S3-S12.
- Ménézo, Y.J., Hazout, A., Panteix, G., et al., 2007. Antioxidants to reduce sperm DNA fragmentation: an unexpected adverse effect. *Reprod. BioMed. Online.* 14, 418-421.

- Omu, A.E., Al-Azemi, M.K., Kehinde, E.O., Anim, J.T., Oriowo, M.A., Mathew, T.C., 2008. Indications of the mechanisms involved in improved sperm parameters by zinc therapy. *Med. Princ. Pract.* 17, 108-116.
- Paradiso Galatioto, G., Gravina, G.L., Angelozzi, G., et al., 2008. May antioxidant therapy improve sperm parameters of men with persistent oligospermia after retrograde embolization for varicocele? *World J. Urol.* 26, 97-102.
- Pasqualotto, F.F., 2007. Investigação e reprodução assistida no tratamento da infertilidade masculina. *Rev. Bras. Ginecol. Obstet.* 29, 103-112.
- Pasqualotto, F.F., Locambo, C.V., Athayde, K.S., Arap, S., 2003. Measuring male infertility: epidemiological aspects. *Rev. Hosp. Clin. Fac. Med. São Paulo.* 58, 173-178.
- Piomboni, P., Gambera, L., Serafini, F., Campanella, G., Morgante, G., De Leo, V., 2008. Sperm quality improvement after natural anti-oxidant treatment of asthenoteratospermic men with leukocytospermia. *Asian J. Androl.* 10, 201-206.
- Piomboni, P., Gambera, L., Serafini, F., Campanella, G., Morgante, G., Leo, V.D., 2008. Sperm quality improvement after natural anti-oxidant treatment of asthenoteratospermic men with leukocytospermia. *Asian J. Androl.* 10, 201-206.
- Ramasamy, R., Stahl, P.J., Schlegel, P.N., 2012. Medical therapy for spermatogenic failure. *Asian J. Androl.* 14, 57-60.
- Rolf, C., Cooper, T.G., Yeung, C.H., Nieschlag, E., 1999. Antioxidant treatment of patients with asthenozoospermia or moderate oligoasthenozoospermia with high-dose vitamin C and vitamin E: a randomized, placebo-controlled, double-blind study. *Hum. Reprod.* 14, 1028-1033.
- Safarinejad, M.R., 2011. Effect of omega-3 polyunsaturated fatty acid supplementation on semen profile and enzymatic anti-oxidant capacity of seminal plasma in infertile men with idiopathic oligoasthenoteratospermia: a double-blind, placebo-controlled, randomised study. *J. Androl.* 43, 38-47.
- Safarinejad, M.R., Shafiei, N., Safarinejad, S., 2011. A prospective double-blind randomized placebo-controlled study of the effect of saffron (*Crocus sativus* Linn.) on semen parameters and seminal plasma antioxidant capacity in infertile men with idiopathic oligoasthenoteratozoospermia. *Phytother. Res.* 25, 508-516.
- Showell, M.G., Brown, J., Yazdani, A., Stankiewicz, M.T., Hart, R.J., 2011. Antioxidants for male subfertility. *Cochrane Database Syst. Rev.* 19, CD007411.
- Sigman, M., Glass, S., Campagnone, J., Pryor, J.L., 2006. Carnitine for the treatment of idiopathic asthenozoospermia: a randomized, double-blinded, placebo-controlled trial. *Fertil. Steril.* 85, 1409-1414.
- Tamura, T., Picciano, M.F., 2006. Folate and human reproduction. *Am. J. Clin. Nutr.* 83, 993-916.
- Tremellen, K., 2008. Oxidative stress and male infertility – a clinical perspective. *Hum. Reprod Update.* 14, 243-258.
- Tremellen, K., Miari, G., Froiland, D., Thompson, J., 2007. A randomised control trial examining the effect of an antioxidant (Menevit) on pregnancy outcome during IVF-ICSI treatment. *Aust. N. Z. J. Obstet. Gynaecol.* 47, 216-221.
- Tunc, O., Thompson, J., Tremellen, K., 2009. Improvement in sperm DNA quality using an oral antioxidant therapy. *Reprod. BioMed. Online.* 18, 761-768.
- Wong, W.Y., Merkus, H.M., Thomas, C.M., Menkveld, R., Zielhuis, G.A., Steegers-Theunissen, R.P., 2002. Effects of folic acid and zinc sulfate on male factor subfertility: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *Fertil. Steril.* 77, 491-498.
- Wong, W.Y., Thomas, C.M., Merkus, J.M., Zielhuis, G.A., Steegers-Theunissen, R.P., 2000. Male factor subfertility: possible causes and the impact of nutritional factors. *Fertil. Steril.* 73, 435-442.

World Health Organization, 1999. Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Sperm–Cervical Mucus Interaction, fourth ed. Cambridge University Press, Cambridge.

Young, S.S., Eskenazi, B., Marchetti, F.M., Block, G., Wyrobek, A.J., 2008. The association of folate, zinc and antioxidant intake with sperm aneuploidy in healthy non-smoking men. Hum. Reprod. 23, 1014-1022.

Table 1. Comparability between experimental and control groups in the pre-intervention phase. LabRep/HC-UFG, 2012.

	Experimental	Control	p
Age (years old)	n=23 35.6 (23-47)	n=26 36.8 (24-56)	0.09
Concentration ($\times 10^6$ /mL)	25.9 (1-108)	20.8 (1-64)	0.17
Motility (%) ^a	46.5 (20-70)	49.2 (25-80)	0.46
Morphology (%) ^b	23.3 (20-30)	22.3 (15-30)	0.09
Vitality (%)	66.7 (50-80)	65.8 (45-85)	0.41

^a median value of progressive motile sperm

^b average normal sperm morphology

Table 2. Patients according to group and effect on semen parameters. LabRep/HC-UFG, 2012.

	Experimental		Control		p
	n	%	n	%	
Improvement in concentration					
Yes	11	47.8	09	34.6	0.51
No	12	52.2	17	65.4	
Improvement in motility					
Yes	10	43.5	11	42.3	0.83
No	13	56.5	15	57.7	
Improvement in morphology					
Yes	09	39.1	15	57.8	0.31
No	14	60.9	11	42.2	
Improvement in vitality					
Yes	09	39.1	11	42.3	0.94
No	14	60.9	15	57.7	

Chi-square Test

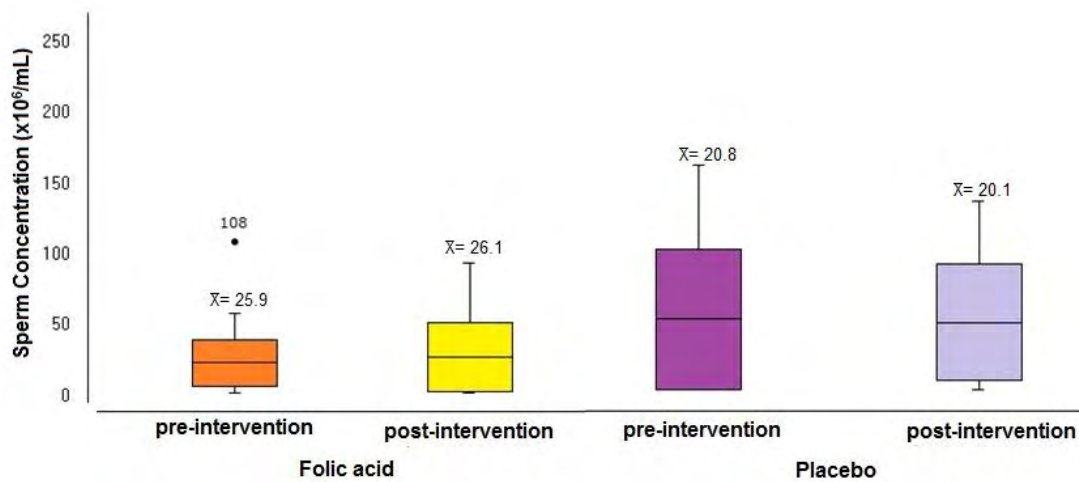


Figure 1. Concentration of spermatozoa in the experimental and control groups before and after folic acid therapy. LabRep/HC-UFG, 2012.

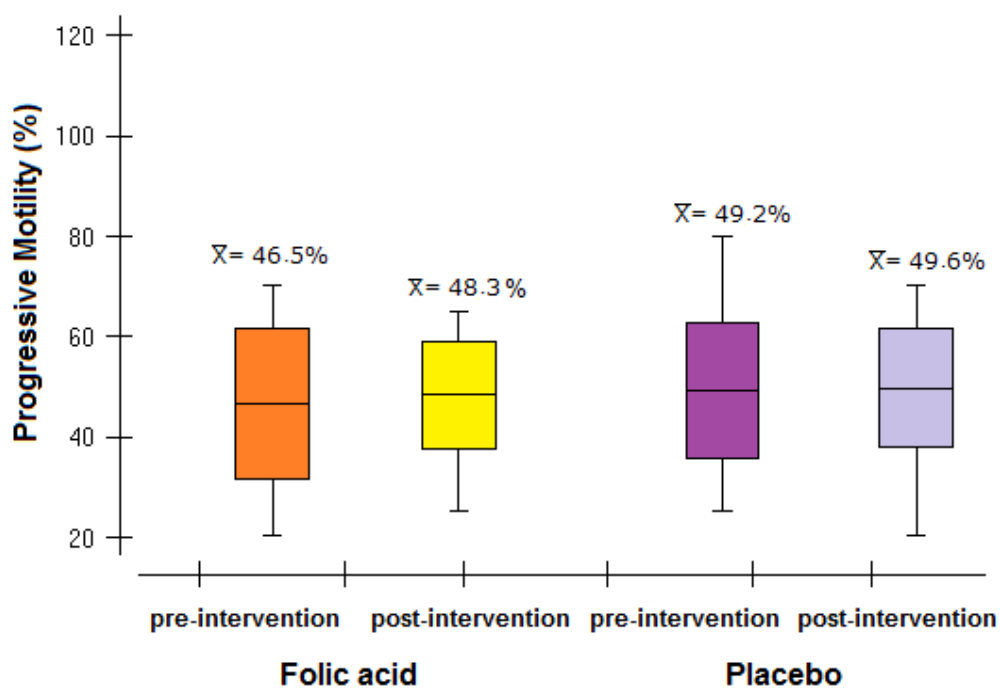


Figure 2. Progressive motility of spermatozoa in the experimental and control groups before and after placebo therapy. LabRep/HC-UFG, 2012.

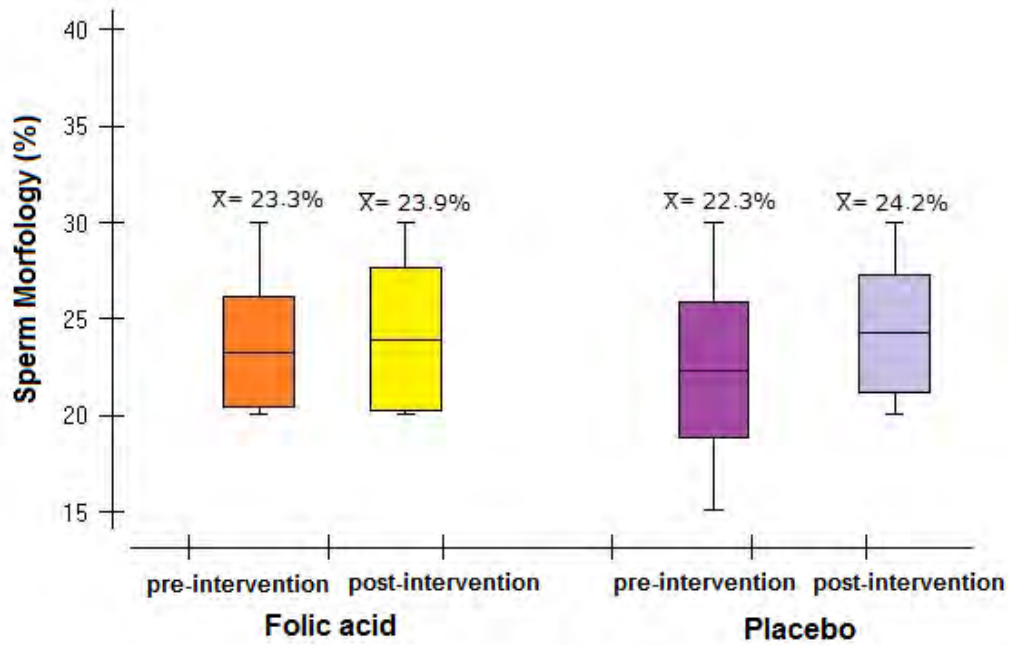


Figure 3. Morphology of spermatozoa in the experimental and control groups before and after folic acid therapy. LabRep/HC-UFG, 2012.

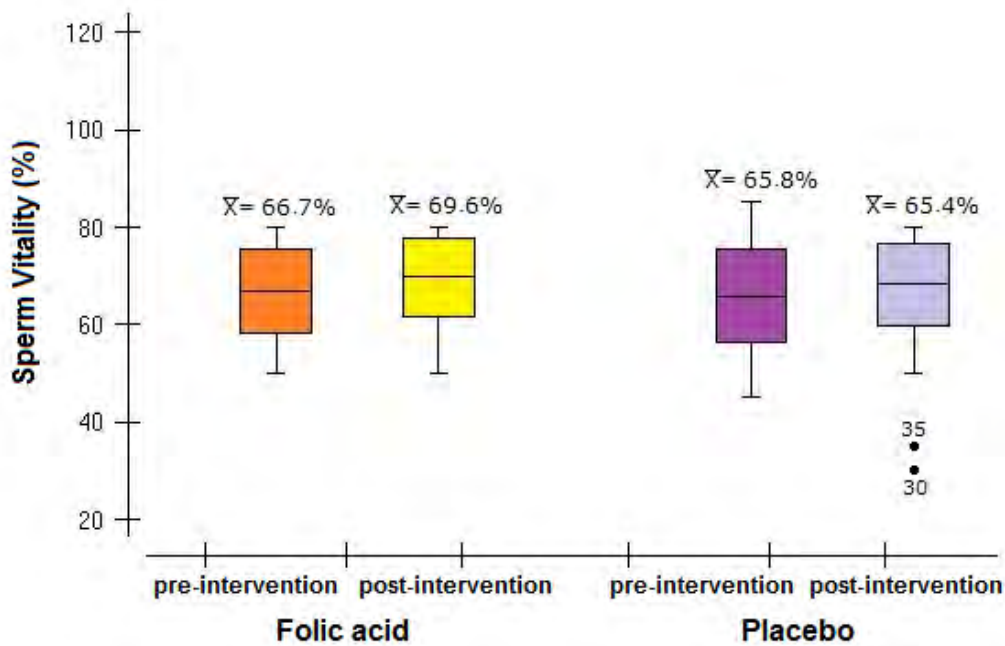


Figure 4. Vitality of spermatozoa in the experimental and control groups before and after placebo therapy. LabRep/HC-UFG, 2012.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nesse estudo, avaliou-se o efeito da administração de ácido fólico (5mg/dia) para homens subférteis. Não encontramos melhora em nenhum dos principais parâmetros do espermograma: concentração, motilidade, morfologia e vitalidade de espermatozóides.

Acreditamos que essa pesquisa possa contribuir no esclarecimento do tema que é bastante controverso na literatura, devido à falta de estudos controlados e randomizados. Além de variações no desenho dos ensaios, verifica-se também a falta de padronização nos fármacos utilizados, dosagem e duração da terapia e a população estudada (desde homens férteis a vários níveis de subfertilidade).

Futuras investigações são necessárias e devem incluir pacientes alvo da terapia antioxidante: aqueles cujos níveis de Espécies Reativas de Oxigênio no sêmen são altos. Desfechos secundários importantes, como as taxas de fertilização e gravidez também devem ser avaliados, pois são os mais almejados em qualquer tratamento de infertilidade. Grandes ensaios, cuidadosamente projetados, randomizados, controlados e com rigorosos critérios de seleção ajudarão a estabelecer de forma clara a utilidade clínica dessa terapia.

7. REFERÊNCIAS

AGARWAL, A. et al. Oxidative stress measurement in patients with male or female factor infertility. Handbook of Chemiluminescent Methods in Oxidative Stress Assessment, p.195-218, 2008. (B)

AGARWAL, A. et al. Reactive oxygen species as an independent marker of male factor infertility. Fertility and Sterility, v.86, n.4, p.878-85, 2006.

AGARWAL, A. et al. Role of antioxidants in treatment of male infertility: an overview of the literature. Reproductive BioMedicine Online, v.8, n.6, p.616-27, 2004.

AGARWAL, A.; MAKKER, K.; SHARMA, R. Clinical Relevance of Oxidative Stress in Male Factor Infertility: An Update. American Journal of Reproductive Immunology, v.59, n.1, p. 2-11, 2008. (A)

AGARWAL, A.; PRABAKARAN, S. A.; SAID, T. M. Prevention of Oxidative Stress Injury to Sperm. Journal of Andrology, v.26, n.6, p.654-60, 2005.

AGARWAL, A.; SALEH, R. A. Role of oxidants in male infertility: rationale, significance, and treatment. Urologic Clinics of North America, v.29, n.4, p.817-27, 2002.

AHMAD, M. K., et al. *Withania somnifera* improves semen quality by regulating reproductive hormone levels and oxidative stress in seminal plasma of infertile males. Fertility and Sterility, v.94, n. 3, p.989-96, 2010.

ALEH, R. et al. Negative effects of increased sperm DNA damage in relation to seminal oxidative stress in men with idiopathic and male factor infertility. Fertility and Sterility, v.79, Suppl.3, p.1597-1605, 2003.

ALVAREZ, J. G. Nurture vs Nature: How can we optimize sperm quality? Journal of Andrology, v.24, n.5, p.640-48, 2003.

AMBROSINI, A. et al. Oleoylethanolamide Protects Human Sperm Cells from Oxidation Stress: Studies on Cases of Idiopathic Infertility. Biology of Reproduction, v.74, n.4, p.659-65, 2006.

AYRES, M. et al. Bioestat: Aplicações estatísticas nas áreas das Ciências Biomédicas. Belém, 2007. Disponível em: <<http://www.mamiraua.org.br>>. Acesso em: 05 mar. 2012.

BALERCIA, G. et al. Coenzyme Q10 treatment in infertile men with idiopathic asthenozoospermia: a placebo-controlled, double-blind randomized trial. Fertility and Sterility, v.91, n.5, p.1785-92, 2009.

BARBOSA, F. F. S. Influência dos antioxidantes na qualidade do sémen de homens em tratamento de fertilidade (dissertação). Universidade de Lisboa, Faculdade de Ciências, Lisboa, 2009. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/10451/1433>> Acesso em: 20 dez. 2011.

BOIVIN J., Bunting L, Collins JA, Nygren KG. International estimates of infertility prevalence and treatment-seeking: potential need and demand for infertility medical care. Human Reproduction, v.22, n.6, p.1506–12, 2007.

BONITA R., BEAGLEHOLE R., KJELLSTRÖM T. Epidemiologia básica. 2ª edição. Cap. 3, pag. 39-61. Editora Santos. 2010.

BOXMEER, J. C. et al. Low folate in seminal plasma is associated with increased sperm DNA damage. Fertility and Sterility, Article In Press, p.1-9,2008.

CHAKRABORTY, Santanu. The role of Na, K-ATPase alpha isoforms and Na/H exchangers in sperm motility. Doctor Degree, Miami University. Ohio, 2006. Disponível em: <http://etd.ohiolink.edu/view.cgi?acc_num=miami1152811549> Acesso em: 10 dez. 2011.

CHI, H. J. et al. Protective effect of antioxidant supplementation in sperm-preparation medium against oxidative stress in human spermatozoa. Human Reproduction, v.23, n.5, p.1023-28, 2008.

CHIORBOLII, E.; SILVA, L. F; PUPO, M. C. O uso do clomifeno em baixa dose por tempo prolongado na subfertilidade masculina. Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia, v. 25, n.1, p.30-3, 1981

CIERESZKO, A.; DABROWSKI, K. Sperm quality and ascorbic acid concentration in rainbow trout semen are affected by dietary vitamin C: an across-season study. Biology of reproduction, v.52, p.982-88, 1994.

COMHAIRE, F. H. et al. Combined conventional/antioxidant "Astaxanthin" treatment for male infertility: a double blind, randomized trial. Asian Journal of Andrology, v.7, n.3, p.257-62, 2005.

COMHAIRE, F. H. et al. The effects of combined conventional treatment, oral antioxidants and essential fatty acids on sperm biology in subfertile men. Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids, v.63, n.3, p.159-65, 2000.

COMHAIRE, F. H. The role of food supplementation in the treatment of the infertile couple and for assisted reproduction. International Journal of Andrology, v.42, n.5, p.331-40, 2010.

DOHLE, G.R. et al. EAU Guidelines on Male Infertility. European Association of Urology, v.48, p.703-11, 2007.

DONNELLY, E. T.; McCLURE, N.; LEWIS, S. E. Antioxidant supplementation in vitro does not improve human sperm motility. Fertility and Sterility, v.72, n.3, p. 484-95, 1999.

DONNELLY, E. T.; McCLURE, N.; LEWIS, S. Glutathione and hypotaurine *in vitro*: effects on human sperm motility, DNA integrity and production of reactive oxygen species. Mutagenesis Journal, v.15, n.1, p.61-8, 2000.

EBISCH, I. M. W. et al. C677T methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism interferes with the effects of folic acid and zinc sulfate on sperm concentration. Fertility and Sterility, v.80, n.5, p.1190-94, 2003.

EBISCH, I. M. W. et al. Does folic acid and zinc sulphate intervention affect endocrine parameters and sperm characteristics in men? International Journal of Andrology, v.29, n.2 , p. 339-45, 2006.

EBISCH, I. M. W. et al. The importance of folate, zinc and antioxidants in pathogenesis and prevention of subfertility. Human Reproduction, v.13, n.2, p.163-74, 2007.

ESKENAZI, B. et al. Antioxidant intake is associated with semen quality in health men. Human Reproduction, v.20, n.4, p.1006-12, 2005.

ESTEVEZ, S. C.; AGARWAL, A. Novel concepts in male infertility. International Brazilian Journal of Urology, v.37, n.1, p.5-15, 2011.

FORGES, T. et al. Les folates: quel impact sur la fertilité? Gynécologie Obstétrique & Fertilité, v.36, n.9, p.930-39, 2008.

FRAGA, C. G. Ascorbic acid protects against endogenous oxidative DNA damage in human sperm. Medical Sciences, v.88, n.24, p.11003-06, 1991.

FREITAS, M.; SIQUEIRA, A.A.F.; SEGRE, C.A.M. Avanços em Reprodução Assistida. Revista Brasileira Crescimento Desenvolvimento Humano, v.18, n.1, p. 93-97, 2008.

GHANEM, H., SHAEER, O.; EI-SEGINI, A. Combination clomiphene citrate and antioxidant therapy for idiopathic male infertility: a randomized controlled trial. Fertility and Sterility, v.93, n.7, p.2232-5, 2010.

GRECO, E. et al. ICSI in cases of sperm DNA damage: beneficial effect of oral antioxidant treatment. Human Reproduction, v.20, n.9, p.2590-94, 2005. (B)

GRECO, E. et al. Reduction of the incidence of sperm DNA fragmentation by oral antioxidant treatment. Journal of Andrology, v.26, n.3, p.349-53, 2005. (A)

GRIVEAU, J. F.; RENARD, P.; LANNOU LE, D. An in vitro promoting role for hydrogen peroxide in human sperm capacitation. International Journal of Andrology, v.17, n.6, p.300-07, 1994.

GURUNATH, S. et al. Defining infertility - a systematic review of prevalence studies. Human Reproduction, v.17, n.5, p.575-88, 2011.

HAMADA, A.; ESTEVES, S. C.; AGARWAL, A. Unexplained male infertility: potential causes and management (Review Article). Human Andrology, v.1, p. 2-16, 2011.

HAWKES, W. C. et al. Selenium supplementation does not affect testicular selenium status or semen quality in North American men. Journal of Andrology, v.30, n.5, p.525-33, 2009.

HIRSH, Anthony. Male Subfertility. British Medical Journal, Clinical review, v.327, p. 669-72, 2003.

IMHOF, M. et al. Micronutrient Supplementation Increases Sperm Quality in the Sub-fertile Male. European Urological Review, v.6, n.2, p.120-23, 2011.

ISIDORI, A. et al. Medical treatment to improve sperm quality. Reproductive BioMedicine Online, v.12, n.6, p.704-14, 2006.

ISIDORI, A.; LATINI, M.; ROMANELLI, F. Treatment of male infertility. Contraception Journal – ELSEVIER, v.72, n.4, p. 314-18, 2005.

KALTHUR, G. et al. Vitamin E supplementation in semen-freezing medium improves the motility and protects sperm from freeze-thaw-induced DNA damage. Fertility and Sterility, v.95, n.3, p.1149-51, 2011.

KEFER, J., AGARWAL, A. and SABANEGH, E. Role of antioxidants in the treatment of male infertility. International Journal of Urology, v.16, n.5, p.449-57, 2009.

KESKES-AMMAR, L. et al. Sperm oxidative stress and the effect of an oral vitamin E and selenium supplement on semen quality in infertile men. Archives of Andrology, v.49, n.2, p.83–94, 2003.

KUPKA, M.S. et al. Impact of female and male obesity on IVF/ICSI: results of 700,000 ART cycles in Germany. Gynecological Endocrinology, v.27, n.3, p.144-49, 2011.

KWIECINSKI, G. G.; PETRIE, G. I.; DeLUCA, H. F. Vitamin D is Necessary for Reproductive Functions of the Male Rat. The Journal of Nutrition, v.119, p.741-44, 1989.

LENZI, A.; SGRO, P.; SALACONE, P. A placebo-controlled double-blind randomized trial of the combined L-carnitine and L-acetyl-carnitine treatment in men with asthenozoospermia. Fertility and Sterility, v.81, n.6, p.1578-84, 2004.

LEWIS, V. et al. Dietary antioxidants and sperm quality in infertile men. Proceedings of the 62nd American Society of Reproductive Medicine Annual Meeting (Supplement). Fertility and Sterility, v.86, n.3, p.S364, 2006.

MACLEOD, J. The role of oxygen in the metabolism and motility of human spermatozoa. American Journal of Physiology, v.138, p.512-18, 1942.

MAIA, M. S.; Bicudo, S. D. Radicais livres, antioxidantes e função espermática em mamíferos: uma revisão. Revista Brasileira de Reprodução Animal, v.33, n.4, p.183-93, 2010.

MAKUCH, M. Y. et al. Inequitable access to assisted reproductive technology for the low-income Brazilian population: a qualitative study. Human Reproduction, v.26, n.8, p. 2054–60, 2011.

MAKUCH, M. Y. et al. Low priority level for infertility services within the public health sector: a Brazilian case study. Human Reproduction, v.25, n.2, p.430-35, 2010.

MARTIN-Du Pan, R. C.; SAKKAS, D. Is antioxidant therapy a promising strategy to improve human reproduction? Are anti-oxidants useful in the treatment of male infertility? Human Reproduction, v.13, n.11, p.2984-85, 1998.

MENDIOLA, J. et al. A low intake of antioxidant nutrients is associated with poor semen quality in patients attending fertility clinics. Fertility and Sterility, v.93, n.4, p.1128-33, 2010.

MENDIOLA, J., TORRES-CANTERO, A. M., AGARWAL, A. Lifestyle factors and male infertility: an evidence-based review. Archives of Medical Science, v.5, n.1A, p.S3-12, 2009.

MENNELLA, M. R. F., JONES, R. Properties of spermatozoal superoxide dismutase and lack of involvement of superoxides in metal-ion-catalysed lipid-peroxidation reactions in semen. Biochemical Journal, v.191, p.289-297, 1980.

MOURA, M. D.; SOUZA, M. C. B.; SCHEFFER, B. B. Reprodução Assistida. Um pouco de história. Revista da Sociedade Brasileira de Reprodução Humana, v.12, n.2, p.23-42, 2009.

MS – Ministério da Saúde. Portal da Saúde. Reprodução Humana Assistida. 2005. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/sas/mac/area.cfm?id_area=832> Acesso em: 10 nov. 2011.

OEDA, T.; HENKEL, R.; OHMORI, H.; SCHILL, W. B. Scavenging effect of N-acetyl-L-cysteine against reactive oxygen species in human semen: a possible therapeutic modality for male factor infertility? International Journal of Andrology, v.29, n.3, p.125-31, 1997.

OEHNINGER, S. et al. Effects of hydrogen peroxide on human spermatozoa. Journal of Assisted Reproduction and Genetics, v.12, n.1, p.41-7, 1995.

OMU, A. E. et al. Indications of the mechanisms Involved in Improved Sperm Parameters by Zinc Therapy. Medical Principles and Practice (International Journal of the Kwait University Health Sciences Centre), v.17, n.2, p.108-16, 2008.

PALERMO, G. et al. Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. The Lancet, v.340, n.8810, p.17-8, 1992.

PARADISO GALATIOTO, G. et al. May antioxidant therapy improve sperm parameters of men with persistent oligospermia after retrograde embolization for varicocele? World Journal of Urology, v.26, n.1, p.97-102, 2008.

PASQUALOTTO, F. F. et al. Measuring Male Infertility: Epidemiological Aspects. Revista do Hospital das Clínicas Faculdade de Medicina de São Paulo, v.58, n.3, p. 173-78, 2003.

PASQUALOTTO, F. F. Investigação e Reprodução Assistida no Tratamento da Infertilidade Masculina. Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia, v.29, n.2, p.103-12, 2007.

PENZIAS, A. S. Recurrent IVF failure: others factors. Fertility and Sterility, v.97, n.5, p.1033-38, 2012.

PIOMBONI, P. et al. Sperm quality improvement after natural anti-oxidant treatment of asthenoteratospermic men with leukocytospermia. Asian Journal of Andrology, v.10, n.2, p.201–6, 2008.

PLESSIS, du S. S. et al. Effects of H₂O₂ exposure on human sperm motility parameters, reactive oxygen species levels and nitric oxide levels. International Journal of Andrology, v.42, n.3, p.206-10, 2010.

RAMASAMY, R.; STAHL, P.; SCHLEGEL, P. Medical therapy for spermatogenic failure. Asian Journal of Andrology, v.14, n.1, p.57–60, 2012.

RedLARA - Red Latinoamericana de Reproducción Asistida. Manual de Procedimientos Laboratorio de Reproduccion Asistida. Red Latinoamericana de Reproducción Asistida, 2006.

ROLF, C. et al. Antioxidant treatment of patients with asthenozoospermia or moderate oligoasthenozoospermia with high-dose vitamin C and vitamin E: a randomized, placebo-controlled, double-blind study. Human Reproduction, v.14, n.4, p.1028-33, 1999.

RUSSO, A. et al. Propolis protects human spermatozoa from DNA damage caused by benzo[a]pyrene and exogenous reactive oxygen species. Life Sciences, v.78, n.13, p.1401-06, 2006.

SAFARINEJAD, M. R. Effect of omega-3 polyunsaturated fatty acid supplementation on semen profile and enzymatic anti-oxidant capacity of

seminal plasma in infertile men with idiopathic oligoasthenoteratospermia: a double-blind, placebo-controlled, randomised study. Journal of Andrology, v.43, n.1, p.38-47, 2011. (B)

SAFARINEJAD, M. R. Effect of pentoxifylline on semen parameters, reproductive hormones, and seminal plasma antioxidant capacity in men with idiopathic infertility: a randomized double-blind placebo-controlled study. International Urology and Nephrology, v.43, n.2, p.315-28, 2011. (A)

SAFARINEJAD, M. R.; SAFARINEJAD, S. Efficacy of selenium and/or N-acetylcysteine for improving semen parameters in infertile men: a double-blind, placebo controlled, randomized study. Journal of Urology, v.181, n.2, p.741-51, 2009.

SAFARINEJAD, M.R., SHAFIEI, N.; SAFARINEJAD, S. A prospective double-blind randomized placebo-controlled study of the effect of saffron (*Crocus sativus* Linn.) on semen parameters and seminal plasma antioxidant capacity in infertile men with idiopathic oligoasthenoteratozoospermia. Phytotherapy Research, v.25, n.4, p. 508-16, 2011.

SAID, T.; et al. Impact of sperm morphology on DNA damage caused by oxidative stress induced by beta-nicotinamide adenine dinucleotide phosphate. Fertility and Sterility, v.83, n.1, p.95-103, 2005.

SHARMA, R. K.; AGARWAL, A. Role of reactive oxygen species in male infertility. Journal of Urology, v.48, n.6, p.835-50, 1996.

SHOWELL, M. et al. Antioxidants for male subfertility (Protocol). Cochrane Database of Systematic Reviews, Issue 4, 2009.

SHOWELL, M. et al. Antioxidants for male subfertility (Review). Cochrane Database of Systematic Reviews, Issue 8, 2011.

SIGMAN, M. et al. Carnitine for the treatment of idiopathic asthenozoospermia: a randomized, double-blinded, placebo-controlled trial. Fertility and Sterility, v.85, n.5, p.1409-14, 2006.

SIKKA, C. S. Role of oxidative stress and antioxidants in Andrology and Assisted Reproductive Technology. Journal of Andrology, v.25, n.1, p.5-18, 2004.

SILVA, F. M.; MARQUES, A.; CHAVEIRO, A. Reactive Oxygen Species: A Double-Edged Sword in Reproduction. The Open Veterinary Science Journal, v.4, p.127-133, 2010.

SILVER, E. W. et al. Effect of Antioxidant Intake on Sperm Chromatin Stability in Healthy Nonsmoking Men. Journal of Andrology, v.26, n.4, p.550-56, 2005.

TAMURA, T.; PICCIANO, M. F. Folate and human reproduction. The American Journal of Clinical Nutrition, v.83, n.5, p.993-16, 2006.

TARLATZIS, B. C.; et al. Evaluation of intrauterine insemination with washed spermatozoa from the husband in the treatment of infertility. Human Reproduction, v.6, n.9, p.1241-46, 1991.

TOHAMY, M. M. E.; The mechanisms by which Oxidative Stress and Free Radical Damage produces Male infertility. Life Science Journal, v.9, n.1, p.674-88, 2012.

TREMELLEN, K. et al. A randomised control trial examining the effect of an antioxidant (Menevit) on pregnancy outcome during IVF-ICSI treatment. Australian and New Zealand Journal of Obstetrics and Gynaecology, v.47, n.3, p.216-21, 2007.

TREMELLEN, K. Oxidative stress and male infertility – a clinical perspective. Human Reproduction, v.14, n.3, p.243-58, 2008.

TUNC, O.; THOMPSON, J.; TREMELLEN, K. Improvement in sperm DNA quality using an oral antioxidant therapy. Reproductive BioMedicine Online, v.18, n.6, p.761-68, 2009.

van PELT, A. M.; ROOIJ, D. G. Retinoic acid is able to reinitiate spermatogenesis in vitamin A-deficient rats and high replicate doses support

the full development of spermatogenic cells. Endocrinology, v.128, n.2, p.697-04, 1991.

VENKATESH, S. S. et al. Clinical significance of reactive oxygen species in semen of infertile Indian men. International Journal of Andrology, v.41, n.4, p.251-6, 2009.

VUJKOVIC, et al. Associations between dietary patterns and semen quality in men undergoing IVF/ICSI treatment. Human Reproduction, v.1, n.1, p.1-9, 2009.

WHO - World Health Organization, Infecundity, infertility, and childlessness in developing countries. Demographic and Health Surveys. DHS Comparative reports, n. 9, Calverton, Maryland, USA, 2004.

WHO - World Health Organization. WHO Laboratory Manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction. 4th ed. Cambridge: Press Syndicate of the University of Cambridge, 1999.

WHO - World Health Organization. WHO Manual for the Standardized Investigation and Diagnosis of the Infertile Couple. Cambridge: Cambridge University Press, 2000.

WONG, W. Y. et al. Effects of folic acid and zinc sulfate on male factor subfertility: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. Fertility and Sterility, v.77, n.3, p.491-98, 2002.

WONG, W. Y. et al. Male factor subfertility: possible causes and the impact of nutritional factors, Fertility and Sterility, v.73, n.3, p.435-42, 2000.

YOUNG, S. S. et al. The association of folate, zinc and antioxidant intake with sperm aneuploidy in healthy non-smoking men. Human Reproduction, Livermore, v.23, n.5, p.1014-22, Mar. 2008.

ZEGERS-HOCHSCHILD, F. et al. International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology (ICMART) and the World Health

Organization (WHO) revised glossary of ART terminology. Fertility and Sterility, v.92, n.5, p.1520-24, 2009.

ZINI, A.; AL-HATHAL, N. Antioxidant therapy in male infertility: fact or fiction? Asian Journal of Andrology, v.13, p.374-81, 2011.

ANEXOS

ANEXO I – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO E DO DESPORTO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
HOSPITAL DAS CLÍNICAS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA MÉDICA HUMANA E ANIMAL

PROTOCOLO CEPMHA/HC/UFG Nº 050/2009

Goiânia, 30/04/2009

INVESTIGADOR RESPONSÁVEL: *Biom. Tatiana Moreira da Silva*

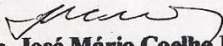
TÍTULO: *“Efeito do ácido fólico no Espermograma de homens Sub - férteis”.*

Área Temática: *Grupo I – Reprodução Humana*

Local de realização: *Hospital das Clínicas/ UFG*

Informamos que o Comitê de Ética em Pesquisa Médica Humana e Animal analisou e aprovou o projeto de pesquisa acima referido, juntamente com os documentos apresentados e o mesmo foi considerado em acordo com os princípios éticos vigentes.

- Informamos que não há necessidade de aguardar o parecer da CONEP- Comissão Nacional de Ética em Pesquisa para iniciar a pesquisa.
- O pesquisador responsável deverá encaminhar ao CEPMHA/HC/UFG, relatórios semestrais do andamento da pesquisa, encerramento, conclusão(ões) e publicação(ões).
- O CEPMHA/HC/UFG pode, a qualquer momento, fazer escolha aleatória de estudo em desenvolvimento para avaliação e verificação do cumprimento das normas da Resolução 196/96 (*Manual Operacional Para Comitês de Ética em Pesquisa – Item 13*).


Farm. José Mário Coelho Moraes
Coordenador do CEPMHA/HC/UFG

1ª AVENIDA, S/Nº, SETOR LESTE UNIVERSITÁRIO - CEP: 74 605-050 - FONE: 3269 8338 - FAX: 3269 8426
GOIÂNIA - GOIÁS

ANEXO II – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Você está sendo convidado (a) para participar, como voluntário, em uma pesquisa. Antes de você decidir, é importante que compreenda porque a pesquisa está sendo feita e o que isso irá envolver. Leia as informações a seguir atentamente e, caso haja necessidade, esclareça as dúvidas com o seu médico ou receba dele mais informações, se desejar.

Após ler com atenção e ser esclarecido (a) sobre as informações a seguir, no caso de aceitar fazer parte do estudo, será solicitado que você preencha, assine e date em duas vias este documento. Uma delas é sua e a outra via é do pesquisador responsável. Em caso de dúvida sobre a pesquisa, você poderá entrar em contato com a pesquisadora responsável, a Biomédica Tatiana Moreira nos telefones: 3269-8278 e 9687-5506 ou com o Dr. Mário Approbato nos telefones: 3269-8278 e 9979-2255. Em caso de dúvidas sobre os seus direitos como participante nesta pesquisa, você poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás, nos telefones: 3269-8338 e 3269-8426.

INFORMAÇÕES IMPORTANTES QUE VOCÊ PRECISA SABER SOBRE A PESQUISA:

Título: Efeito do Ácido Fólico na Qualidade do Espermograma de Homens Subférteis.

O trabalho será conduzido pela equipe do Laboratório de Reprodução Humana do Hospital das Clínicas da UFG, composta por ginecologista, urologista e biomédicos da área de Reprodução Humana com o objetivo de avaliar os possíveis benefícios do ácido fólico (suplementação) na qualidade do espermograma em casais subférteis.

Caso concorde em participar da pesquisa, você terá 50% de chances de receber ácido fólico e 50% de chances de receber placebo, isto é, comprimidos semelhantes à medicação, mas sem qualquer atividade. Nem você, nem o seu médico saberão qual tratamento você está recebendo (ácido fólico ou placebo). A medicação do estudo não irá substituir os seus tratamentos atuais para infertilidade, mas será tomada junto com estes.

Cabe a você decidir se quer participar, ou não, neste estudo. Se você concordar em participar, você deve tomar o medicamento durante três meses consecutivos, e fazer espermograma no início e no fim desse período. Caso você decida não participar, isto não irá afetar o padrão de cuidados médicos que você está recebendo atualmente. O seu médico continuará tratando-o de forma normal.

O ácido fólico é uma vitamina amplamente prescrita para gestantes com a finalidade de prevenir malformações no feto, portanto, com muito baixos efeitos adversos. Por se tratar de uma medicação já preconizada, não há agravos à saúde como intoxicação ou outros efeitos importantes, sendo que, o risco se concentra apenas no campo dos possíveis efeitos colaterais, como qualquer

outra medicação, tais como: reações de natureza alérgica (febre e erupções de pele) em pessoas suscetíveis. Além disso, para a dose em que será utilizado o ácido fólico no nosso estudo (5mg/dia) não há relatos de efeitos colaterais clinicamente significativos.

Você terá direito a pleitear indenização se qualquer efeito danoso permanente ocorrer único e exclusivamente pelo uso da medicação. Ressaltamos mais uma vez que a possibilidade de efeitos indesejáveis é bem pequena.

A sua participação não lhe trará nenhum ônus. A medicação será fornecida gratuitamente por todo o período de tratamento (03 meses) e os exames serão realizados no Laboratório de Reprodução Humana, subsidiados pela instituição, pois já fazem parte da rotina de atendimento.

Os benefícios da sua participação são primordialmente o auxílio na busca de alternativas menos onerosas e intervencionistas para aumento das chances de gravidez em casais subférteis. Outros métodos de tratamentos nesses casos são as Técnicas de Reprodução Assistida: inseminação artificial intra-uterina, fertilização in vitro (FIV) e injeção intracitoplasmática de espermatozóide (ICSI).

Caso você concorde em participar da pesquisa, os seus dados pessoais serão coletados e mantidos em sigilo. Os resultados deste estudo podem ser publicados em jornais médicos ou usados em relatórios científicos, mas o seu nome jamais aparecerá.

As informações do tratamento que você recebeu durante o estudo somente podem ser reveladas após a conclusão do mesmo e a análise dos resultados a fim de preservar a validade da pesquisa.

Diante do exposto, garantimos expressa liberdade de não aceitação. Caso você decida participar, você ainda é livre para se retirar do trabalho a qualquer momento por qualquer motivo, sem prejuízo da continuidade do acompanhamento e tratamento usual que está recebendo. Asseguramos que todos os dados coletados serão utilizados para essa linha de pesquisa e não serão armazenados para estudos futuros.

Pesquisador responsável: Tatiana Moreira da Silva

Assinatura: _____

CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO SUJEITO DA PESQUISA

Eu,

RG: _____ CPF: _____ Prontuário: _____,
abaixo assinado, concordo em participar do estudo: **“Efeito do Ácido Fólico na Qualidade do Espermograma de Homens Sub-férteis”**, sob a responsabilidade da biomédica Tatiana Moreira, como sujeito voluntário.

Fui devidamente informado e esclarecido pela pesquisadora Tatiana Moreira sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes de minha participação. Foi me garantido que posso retirar meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer penalidade ou interrupção de meu acompanhamento/assistência/tratamento.

Minha identidade jamais será divulgada e qualquer informação coletada permanecerá em sigilo.

Declaro que recebi uma via deste documento assinada por mim e pela pesquisadora responsável.

Local e data:

Nome:

Assinatura:

Pesquisador: Tatiana Moreira da Silva

Assinatura:

Presenciamos a solicitação de consentimento, esclarecimento sobre a pesquisa e aceite do sujeito em participar.

Testemunhas (não ligadas à equipe de pesquisadores):

Nome: _____

Assinatura: _____

Nome: _____

Assinatura: _____

ANEXO III – Ficha de Atendimento – Coleta de Dados

Nº Prontuário: _____ Data da consulta: / /
Paciente: _____ Idade: _____
Cônjuge: _____ Idade do cônjuge: _____

Endereço:
Rua/Av.: _____ Complemento: _____
Setor: _____ Cidade: _____ Fones: _____

Tempo de relação sexual desprotegida: _____
Tabagismo: () sim () não Etilismo: () sim () não Uso de drogas: () sim () não
Uso de medicações: () sim () não Qual? _____
Cirurgia prévia: () sim () não Qual? _____

Tratamento prévio para subfertilidade: () sim () não Qual? _____
Assinatura do Termo de Consentimento: () sim () não

➤ EXAMES 1ª CONSULTA

1º Espermograma (data: / /)

Nº de SPTZ= x 10⁶/mL
A= %
B= %
C= %
D= %
Vitalidade= %
Morfologia:
Normais= %
Anormais= %
(Cabeça= %, Peça intermediária= %, Cauda= %)

2º Espermograma (data: / /)

Nº de SPTZ= x 10⁶/mL
A= %
B= %
C= %
D= %
Vitalidade= %
Morfologia:
Normais= %
Anormais= %
(Cabeça= %, Peça intermediária= %, Cauda= %)

➤ TRATAMENTO:

Tipo de Medicação: _____

➤ EXAME RETORNO:

Data: / /

Espermograma

Nº de SPTZ= x 10⁶/mL
Motilidade:
A= %
B= %
C= %
D= %
Vitalidade= %
Normais= %
Anormais= %
(Cabeça= %, Peça intermediária= %, Cauda= %)

ANEXO IV – Normas de Publicação JBRA Assisted Reproduction

8

INFORMAÇÕES GERAIS

1. O JBRA Assisted Reproduction (JBRA Assist. Reprod) é publicação oficial da Sociedade Brasileira de Reprodução Assistida (SBRA – www.sbra.com.br) e da Rede Latino-Americana de Reprodução Assistida (www.redlara.com) para conteúdos científicos, com periodicidade bimestral. É dirigido a especialistas e pesquisadores em saúde, particularmente ginecologistas, andrologistas, biólogos, urologistas e embriologistas. São aceitos para avaliação estudos básicos e clínicos nas áreas de reprodução assistida, infertilidade, genética reprodutiva, imunologia reprodutiva, andrologia, microbiologia reprodutiva, laboratório em reprodução assistida e endocrinologia ginecológica, sob a forma de artigos originais, artigos de revisão, artigos de atualização e relatos de caso (conforme detalhamento a seguir). Os artigos podem ser submetidos nos idiomas português, espanhol ou inglês. Autores interessados em traduzir seu artigo para inglês podem solicitar um orçamento de tradução ao J Bras Rep Assist.

2. Artigos submetidos ao JBRA Assisted Reproduction devem ser inéditos, isto é, não devem ter sido publicados nem submetidos para análise por outras revistas, no todo ou parcialmente. Em casos de figuras já publicadas, autorização deve ser obtida e a fonte deve ser citada. Uma vez publicados, os artigos passam a ser de propriedade da SBRA.

3. As Instruções para Autores do JBRA Assisted Reproduction incorporam as recomendações dos Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals. A versão completa do texto está disponível em www.lcmj.org. Manuscritos que estiverem em desacordo com as instruções aqui apresentadas serão devolvidos para a incorporação de ajustes antes da avaliação pelo Conselho Editorial.

4. Todo artigo publicado no JBRA Assisted Reproduction passa pelo processo de revisão por especialistas (peer review). Os artigos submetidos são primeiramente encaminhados aos editores para uma avaliação inicial quanto ao escopo do trabalho e às exigências editoriais do Journal. Se a avaliação é positiva, o artigo é enviado a dois revisores especialistas na área pertinente. Todo o processo é anônimo, ou seja, os revisores são cegos quanto à identidade dos autores e seu local de origem e vice-versa. Após a avaliação do artigo pelos revisores, os artigos podem ser aceitos sem modificações, recusados ou devolvidos aos autores com sugestões de modificações, sendo que cada artigo pode retornar várias vezes aos autores para esclarecimentos e modificações, sem que isso implique necessariamente a aceitação futura do trabalho.

5. O número de autores de cada manuscrito fica limitado a seis. O conceito de co-autoria implica contribuição substancial na concepção e planejamento do trabalho, análise e interpretação dos dados e redação ou revisão crítica do texto. Contribuições significativas feitas ao estudo, mas que não se enquadram nesses critérios, podem ser citadas na seção de agradecimentos.

6. Artigos de pesquisas clínicas (clinical trials) devem ser registrados em um dos Registros de Ensaio Clínico validado pelos critérios estabelecidos pela Organização Mundial da Saúde e pelo International Committee of Medical Journal Editors (por exemplo, www.actr.org.au, www.clinicaltrials.gov, www.ISRCTN.org, www.umin.ac.jp/ctr/index/htm e www.trialregister.nl). O número de identificação do estudo deverá ser apresentado ao final do resumo.

7. Para textos que forem aceitos para publicação, uma declaração, assinada por todos os autores deverá ser enviada à revista, contendo as seguintes informações: a) o manuscrito é original; b) o manuscrito não foi publicado nem submetido a outra revista, nem o será se vier a ser publicado no JBRA Assisted Reproduction; c) todos os autores participaram ativamente na elaboração do estudo e aprovaram a versão final do texto; d) situações de potencial conflito de interesse (financeiro ou de outra natureza) estão sendo informadas; e) foi obtida aprovação do estudo pelo comitê de ética da instituição à qual o trabalho está vinculado

Instruções para Autores

(para artigos que relatem dados de pesquisa experimental: f) foi obtido consentimento informado dos pacientes incluídos no estudo (quando aplicável). As informações sobre a aprovação do estudo por comitê de ética e a obtenção de consentimento informado também devem constar na seção Métodos do artigo.

8. Antes da publicação dos artigos aceitos, os autores correspondentes receberão, via e-mail, em arquivo PDF, o artigo editorado para aprovação. Nessa fase, as correções devem limitar-se a erros tipográficos, sem alteração do conteúdo do estudo. Os autores deverão devolver as provas aprovadas via e-mail ou fax até 48 horas após o recebimento da mensagem.

TIPOS DE ARTIGOS PUBLICADOS

Artigos originais. Trabalhos resultantes de pesquisa científica que apresentam dados originais sobre aspectos experimentais ou observacionais de caráter médico, biológico, bioquímico e psicossocial e incluem análise estatística descritiva e/ou inferências de dados próprios. Esses artigos têm prioridade para publicação. Devem ser compostos de: página de rosto, resumo e palavras-chave, abstract e keywords, texto (dividido nas seções Introdução, Métodos, Resultados, Discussão ou equivalentes, Conclusões), agradecimentos (se aplicável), lista de referências (máximo de 40), tabelas (se houver), legendas de figuras (se houver) e figuras (se houver).

Artigos de revisão. Trabalhos que têm por objetivo resumir, analisar, avaliar ou sintetizar trabalhos de investigação já publicados em revistas científicas. Devem incluir síntese e análise crítica da literatura levantada e não ser confundidos com artigos de atualização. Devem ser compostos de: página de rosto, resumo e palavras-chave, abstract e keywords, texto, lista de referências, tabelas (se houver), legendas de figuras (se houver) e figuras (se houver).

Artigos de atualização ou opinião. Trabalhos que relatam informações geralmente atuais sobre tema de interesse para determinadas especialidades (por exemplo, uma nova técnica ou método). Têm características distintas de um artigo de revisão, visto que não apresentam análise crítica da literatura. Devem ser compostos de: página de rosto, resumo e palavras-chave, abstract e keywords, texto, lista de referências, tabelas (se houver), legendas de figuras (se houver) e figuras (se houver).

Relatos de caso. Artigos que representam dados descritivos de um ou mais casos, explorando um método ou problema através de exemplo(s). Os casos escolhidos devem ser de grande interesse, com doença ou evolução incomuns ou submetidos a tratamentos inusitados ou alternativos. Podem envolver humanos ou animais e devem apresentar as características do indivíduo estudado (sexo, idade, etc.). Devem ser compostos de: página de rosto, resumo e palavras-chave, abstract e keywords, texto (dividido nas seções Introdução, Descrição do caso e Discussão ou equivalentes), lista de referências, legendas de figuras (se houver) e figuras (se houver).

Cartas ao leitor. Cartas ao editor comentando, discutindo ou criticando os artigos publicados no JBRA Assisted Reproduction serão bem recebidas e publicadas desde que aceitas pelo Conselho Editorial. Devem ser compostas de: título, nome do autor, identificação da publicação que está sendo comentada e lista de referências (se houver). Recomenda-se um máximo de 500 palavras, incluindo referências. Sempre que possível, uma resposta dos autores será publicada juntamente com a carta.

PREPARAÇÃO DOS ORIGINAIS

Utilize preferencialmente o processador de texto Microsoft Word®. Os trabalhos devem ser digitados em fonte Times New Roman tamanho 12, espaço simples, alinhados à esquerda, iniciando cada seção em página nova, na seguinte ordem: página de rosto, resumo e palavras-chave, abstract e keywords, texto, agradecimentos, lista de referências, tabelas, legendas de figuras e figuras. Todas as páginas devem ser numeradas.

Siglas devem ser definidas por extenso na primeira ocorrência no texto; após a primeira ocorrência, somente a sigla deverá ser utilizada. No resumo, o uso de siglas deve ser evitado. Substâncias devem ser apresentadas utilizando seu nome genérico. Se relevante, o nome comercial da substância e o fabricante podem ser informados entre parênteses. A apresentação de unidades de medida deve seguir o sistema internacional (SI).
Genes de animais devem ser apresentados em itálico com inicial maiúscula (exemplo: Sox2); genes de seres humanos também devem ser apresentados em itálico, porém com todas as letras maiúsculas (exemplo: SOX2). Proteínas devem seguir o mesmo padrão de maiúsculas/minúsculas, porém sem itálico.

PÁGINA DE ROSTO

A página de rosto deve conter:

- Título conciso e explicativo, representando o conteúdo do trabalho, em português e inglês
- Título resumido (máximo de 40 caracteres)
- Nomes dos autores
- Afiliação dos autores, indicando departamento/unidade, instituição e região geográfica
- Nome da instituição onde o trabalho foi executado
- Informações sobre auxílios recebidos sob a forma de financiamento, equipamentos ou medicamentos
- Congressos onde o estudo foi apresentado
- Nome, endereço, telefone, fax e e-mail do autor correspondente

RESUMO E ABSTRACT

Todos os trabalhos devem apresentar um resumo em português e um abstract em inglês. Trabalhos escritos em espanhol devem apresentar, além do resumo no idioma original, também um resumo em português e um abstract em inglês. O conteúdo dos textos deve ser idêntico, e não deve ultrapassar 250 palavras. Para artigos originais, o resumo deve ser estruturado como segue: Objetivo, Métodos, Resultados e Conclusões. Para relatos de caso, artigos de revisão e artigos de atualização, o resumo não deve ser estruturado. Deve-se evitar o uso de abreviações no resumo, e não devem ser citadas referências. Logo após o resumo/abstract/resumen, deverão ser apresentadas de três a seis palavras-chave que sejam integrantes da lista de Descritores em Ciências da Saúde (<http://decs.bvs.br>).

AGRADECIMENTOS

Esta seção é dedicada a reconhecer o trabalho de pessoas que tenham colaborado intelectualmente, mas cuja contribuição não justifica co-autoria, ou de pessoas ou instituições que tenham dado apoio material.

REFERÊNCIAS

No texto, as citações serão identificadas entre parênteses, pelo sobrenome do autor seguido do ano de publicação. Exemplos: um autor (Stephoe, 1978), dois autores (Edwards & Steptoe, 1980), mais de dois autores (Van Steirteghem et al., 1988).

A lista de referências deve ser apresentada em ordem alfabética (último sobrenome de cada autor seguido das duas primeiras iniciais), e não deve ser numerada. Trabalhos do mesmo autor devem ser ordenados cronologicamente; trabalhos de mesmo autor e ano devem ser identificados com letras após o ano (2000a, 2000b, etc.). A apresentação das referências seguirá os modelos propostos nos Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals (ver exemplos a seguir). Todas as referências citadas na lista devem ser mencionadas no texto e vice-versa.

1. Artigo de periódico

Edwards RG, Steptoe PC, Purdy JM. Establishing full-term human pregnancies using cleaving embryos grown in vitro. Br J Obstet Gynaecol. 1980;87:737-56.

2. Livro

Wolf DP, Quigley MM, eds. Human in vitro fertilization and embryo transfer. New York: Plenum Press; 1984.

3. Capítulo de livro

Simpson JL. Gonadal dysgenesis and sex abnormalities: phenotypic-karyotypic correlations. In: Vallet HL, Porter IH, eds. Genetic mechanisms of sexual development. New York: Academic Press; 1979. p. 365-77.

4. Artigo de revista eletrônica

Abood S. Quality improvement initiative in nursing homes: the ANA acts in an advisory role. Am J Nurs [revista eletrônica]. 2002 Jun [citado 2002 ago 12];102(6):[aproximadamente 3 p.]. Disponível em: <http://www.nursingworld.org/AJN/2002/june/Wawatch.htm>.

5. Artigo publicado na Internet:

Wantland DJ, Portillo CJ, Holzemer WL, Slaughter R, McGhee FM. The effectiveness of web-based vs. non-web-based interventions: a meta-analysis of behavioral change outcomes. J Med Internet Res. 2004;6(4):e40. Disponível em: <http://www.jmir.org/2004/4/e40/>. Acessado: 29/11/2004.

6. Site

Oncolink [site na Internet]. Philadelphia: University of Pennsylvania; c1994-2006. [atualizado 2004 set 24; citado 2002 mar 14]. Disponível em: <http://cancer.med.upenn.edu/>.

7. Software

Smallwaters Corporation. Analysis of moment structures: AMOS [software]. Version 5.0.1. Chicago: Smallwaters; 2003.

TABELAS E FIGURAS

Tabelas e figuras (gráficos, fotografias, etc.) devem ser numeradas em algarismos arábicos conforme a ordem de aparecimento no texto e devem ter legendas individuais, apresentadas ao final do trabalho. Cada tabela e figura deve ser submetida em folha separada.

Nas tabelas, deverão ser utilizadas apenas linhas horizontais, e cada dado deverá constar em uma célula independente. Explicações sobre itens das tabelas devem ser apresentadas em notas de rodapé identificadas pelos seguintes símbolos, nesta sequência: *, †, §, ||, ¶, **, ††, †††.

Figuras em geral (gráficos, fotografias, etc.) serão publicadas em preto e branco. Despesas com a eventual reprodução de fotografias em cor serão de responsabilidade do autor.

Figuras podem ser submetidas eletronicamente, nas extensões .jpg, .gif ou .tif, com resolução mínima de 300 dpi (para possibilitar uma impressão nítida), ou por correio (ver Instruções de envio mais adiante). Todas as figuras enviadas pelo correio devem ser identificadas no verso com o uso de etiqueta colante contendo o nome do primeiro autor, o número da figura e uma seta indicando o lado para cima.

Fotografias escaneadas não serão aceitas; fotografias em papel devem ser encaminhadas pelo correio. Fotografias de pacientes não devem permitir sua identificação.

Gráficos devem ser apresentados somente em duas dimensões.

Figuras já publicadas e incluídas em artigos submetidos devem indicar a fonte original na legenda e devem ser acompanhadas por uma carta de permissão do detentor dos direitos (editora ou revista).

ENVIO/SUBMISSÃO DE ARTIGOS

Os artigos devem ser submetidos preferencialmente por email (journalsbra@cmb.com.br). Texto e figuras devem ser enviadas como um anexo à mensagem. Figuras (exclusivamente gráficos e fotografias digitais) podem ser enviadas nas extensões .jpg, .gif ou .tif, com resolução mínima de 300 dpi e tamanho máximo total (do conjunto de figuras) de 3 MB. Se a submissão por email não for possível, duas cópias do texto e figuras devem ser enviadas para o endereço a seguir:

Profa. Dra. Maria do Carmo Borges de Souza
Editora do Jornal Brasileiro de Reprodução Assistida
Centro Médico BarraShopping
Av. das Américas, 4666, salas 312/313
CEP 22649-900 □ Rio de Janeiro, RJ
Fone: (21) 2430.9060
Fax: (21) 2430.9070
<http://www.sbra.com.br>

ANEXO V – Normas de Publicação *Reproductive Biomedicine*

Online



REPRODUCTIVE BIOMEDICINE ONLINE

An international journal devoted to biomedical research on human conception and the welfare of the human embryo

AUTHOR INFORMATION PACK

TABLE OF CONTENTS

• Description	p.1
• Impact Factor	p.1
• Abstracting and Indexing	p.1
• Editorial Board	p.2
• Guide for Authors	p.4



ISSN: 1472-6483

DESCRIPTION

if2011_2285.jpg

Official journal of Alpha (Scientists in Reproductive Medicine), American College of Embryology (ACE), the Global Chinese Association for Reproductive Medicine (GCARM), the International Society for Fallopian Tubes and Reproductive Surgery (ISFT-RS), the International Society for In Vitro Fertilization (ISIVF), the Mediterranean Society for Reproductive Medicine (MSRM), the Preimplantation Genetic Diagnosis International Society (PGDIS) and the Turkish Society of Reproductive Medicine (TSRM).

Reproductive BioMedicine Online covers the formation, growth and differentiation of the human embryo. It is intended to bring to public attention new research on biological and clinical research on human reproduction and the human embryo including relevant studies on animals. It is published by a group of scientists and clinicians working in these fields of study. Its audience comprises researchers, clinicians, practitioners, academics and patients.

Context

The period of human embryonic growth covered is between the formation of the primordial germ cells in the fetus until mid-pregnancy. High quality research on lower animals is included if it helps to clarify the human situation. Studies progressing to birth and later are published if they have a direct bearing on events in the earlier stages of pregnancy.

IMPACT FACTOR

2010: 2.285 © Thomson Reuters Journal Citation Reports 2011

ABSTRACTING AND INDEXING

Chemical Abstracts
Current Contents / Clinical Medicine
EMBASE
MEDLINE®
Science Citation Index Expanded
Scopus

EDITORIAL BOARD

Senior Editor:

Jacques Cohen, West Orange, NJ, USA

Editors:

Gedis Grudzinskas, London, UK

Martin Johnson, Cambridge, UK

Editor Emeritus:

Robert G. Edwards, Cambridge, UK

Section Editors:

Ashok Agarwal (male infertility), Cleveland, OH, USA

Kamal Ahuja (gamete donation: eggs and sperm), London, UK

Hesham Al-Inany (reproductive health and epidemiology), Cairo, Egypt

Mina Alikani (embryos: clinical), Manhasset, NY, USA

Giuseppe Benagiano (ethics, social, legal, political), Rome, Italy

Robert Casper (clinical technology of assisted reproduction), Toronto, Canada

David Cram (stem cells and nuclear transplantation), Clayton, Australia

Chris De Jonge (male infertility), Minneapolis, MN, USA

Ursula Eichenlaub-Ritter (oocytes: basic science and biology), Bielefeld, Germany

Kay Elder (oocytes: clinical aspects), Cambridge, UK

Juan Garcia-Velasco (reproductive endocrinology: assisted reproduction), Madrid, Spain

Norbert Gleicher (assisted reproduction: outcomes), Chicago, IL, USA

Eric Jauniaux (physiology of pregnancy), London, UK

Martin Johnson (embryos: basic science and experimental aspects), Cambridge, UK

Efstathios Kolibianakis (ovary), Thessaloniki, Greece

Cornelius Lambalk (pregnancy and pregnancy rate after assisted reproduction), Amsterdam, The Netherlands

Michael Ludwig (evidence-based medicine), Hamburg, Germany

Nicholas Macklon (female infertility), Rotterdam, The Netherlands

Yves Ménézo (reproductive biochemistry and physiology), Paris, France

Zsolt Peter Nagy (cryopreservation and vitrification: laboratory aspects), Atlanta, GA, USA

Luciano Nardo (reproductive surgery and endometriosis), Manchester, UK

Malcolm Nicolson (history of science and medicine), Glasgow, UK

Nicole Noyes (cryopreservation and vitrification: clinical aspects), New York, NY, USA

Pasquale Patrizio (reproductive endocrinology: other), New Haven, CT, USA

Thomas Pool (laboratory technology of assisted reproduction), San Antonio, TX, USA

Joe Leigh Simpson (genetic causes of infertility), New York, NY, USA

Jonathan Van Blerkom (fertilization), Boulder, CO, USA

Dagan Wells (preimplantation genetic diagnosis), New Haven, CT, USA

Editorial Board:

Safaa Al-Hasani, Lübeck, Germany

Monica Antinori, Rome, Italy

Gulam Bahadur, London, UK

Basak Balaban, Istanbul, Turkey

Juan Balasch, Barcelona, Spain

Izhar Ben-Shlomo, Haifa, Israel

Andrea Borini, Bologna, Italy

Jacques Cohen, West Orange, NJ, USA

Joao Cunha-Filho, Porto Alegre, Brazil

Petra De Sutter, Ghent, Belgium

Necati Findikli, Istanbul, Turkey

Jose Franco Jr, Ribeirao Preto, Brazil

Georg Griesinger, Lübeck, Germany

Samir Hamamah, Montpellier, France

Chris Hansis, Los Angeles, CA, USA

Geraldine Hartshorne, Coventry, UK

Outi Hovatta, Huddinge, Sweden

Semra Kahraman, Istanbul, Turkey

Minoru Ko, Baltimore, MD, USA

Anver Kuliev, Chicago, IL, USA

Masashige Kuwayama, Tokyo, Japan

William Ledger, Sheffield, UK

Sheena Lewis, Belfast, UK

Kersti Lundin, Gothenburg, Sweden
Ioannis Messinis, Larissa, Greece
Markus Montag, Heidelberg, Germany
Takahide Mori, Kyoto, Japan
Tetsunori Mukaida, Hiroshima, Japan
Santiago Munné, West Orange, NJ, USA
Willem Ombelet, Genk, Belgium
Alan Penzias, Waltham, MA, USA
Catherine Racowsky, Boston, MA, USA
Pierre Ray, Paris, France
Laura Rienzi, Rome, Italy
Mark Sauer, New York, NY, USA
Lynette Scott, Reading, MA, USA
Lalji Singh, Hyderabad, India
James Stachecki, Livingston, NJ, USA
Eric Surrey, Lone Tree, CO, USA
Togas Tulandi, Montreal, Canada
Alicia Ubeda, Barcelona, Spain
Alfredo Ulloa-Aguirre, Mexico
Pierre Vanderzwalmen, Brussels, Belgium
Eurof Walters, Cambridge, UK

Emeritus Editorial Board:

Jose Balmaceda, Santiago, Chile
Henning Beier, Aachen, Germany
Jim Cummins, Murdoch, Australia
Salim Daya, Hamilton, Canada
Arun Dharmarajan, Perth, Australia
Klaus Diedrich, Lübeck, Germany
René Frydman, Clamart, France
Victor Gomel, Vancouver, Canada
Timur Gürgan, Ankara, Turkey
Peter Hollands, London, UK
Aaron Hsueh, Stanford, CA, USA
Robert Norman, Adelaide, Australia
Jagannadha Rao, Bangalore, India
Carlos Simón, Valencia, Spain
Seang Lin Tan, Montreal, Canada
Jan Tesarik, Granada, Spain
Peter Vogt, Heidelberg, Germany

Editorial Office:

, Duck End Farm, Park Lane, Dry Drayton, Cambridge CB23 8DB, UK, **Email:** office@rbmonline.com

GUIDE FOR AUTHORS

INTRODUCTION

This journal covers the formation, growth and differentiation of the human embryo. It is intended to bring to public attention new research on biological and clinical research on human reproduction and the human embryo including relevant studies on animals. Its audience comprises researchers, clinicians, practitioners, academics and patients.

Context

The period of human embryonic growth covered is between the formation of the primordial germ cells in the fetus until mid-pregnancy. High quality research on lower animals is included if it helps to clarify the human situation. Studies progressing to birth and later are published if they have a direct bearing on events in the earlier stages of pregnancy.

Relevant topics

- Fertility and infertility
- IVF and assisted reproduction
- Reproductive endocrinology
- Reproductive physiology
- Fertilization
- Gamete donation
- Oocyte and ovary
- Embryology
- Preimplantation genetic diagnosis (PGD)
- Genetic disorders afflicting the embryo and their alleviation
- Cloning
- Stem cells
- Implantation and organogenesis
- Pregnancy, fetus and birth
- Ethics, social, legal, counselling

Ethics Bioscience and Life

Constant attention is applied to ethical matters. Where appropriate, articles covering ethical, religious and political topics arising through the treatment and care of various clinical conditions will be published in *Ethics Bioscience and Life*, an occasional supplement to the main journal that shares its impact factor. This supplement is published twice annually.

Types of papers

Original articles: a full-length report of original basic or clinical investigation. An abstract in a single paragraph with no subheadings, 200 words maximum is required. This should be comprehensible to readers before they read the article. Avoid abbreviations and reference citations. The rest of the paper should be structured as follows: Introduction, Materials and methods, Results, Discussion, Acknowledgements, References. RBMOnline gives priority to reports of original research that are likely to change clinical practice or thinking about a disease. Submission of randomized controlled trials requires inclusion of a checklist and flowchart in accordance with the CONSORT guidelines and the registration number of the trial and the name of the trial registry.

Short communications: these must not exceed 1,000 words with no more than one table or illustration and five references. An abstract of no more than 100 words is required, presented in a single paragraph with no subheadings. The text should be structured in four parts: Introduction, Methods, Results and Discussion.

Review articles: a comprehensive review of prior publications relating to an important clinical subject. An abstract of no more than 200 words is required, presented in a single paragraph with no subheadings. The Introduction should indicate why the topic is important and should state the specific objective(s) of the review. The Conclusion should include the clinical implications and observations regarding the need for additional research. Systematic reviews should follow the PRISMA guidelines. Meta-analysis of observational studies should follow the MOOSE guidelines. Further information can be obtained from the EQUATOR web site: <http://www.equator-network.org/resource-centre/library-of-health-research-reporting/reporting-guidelines>

Ethics, social, legal, counselling: articles covering ethical, religious and political topics arising through the treatment and care of various clinical conditions in the field of reproductive medicine. An abstract in a single paragraph with no subheadings, 200 words maximum is required. The text can be unstructured or structured under headings of author's choice.

Commentaries: for topics that authors wish to 'air'. Must not exceed 2,000 words with no more than one table or illustration and 10 references. An abstract in a single paragraph with no subheadings, 200 words maximum is required. The text can be unstructured or structured under headings of author's choice.

Letters to the Editor: a question or challenge to an article published recently in RBMOnline. Letters must be received within 6 weeks of publication of the article to which they refer and should be no longer than 250 words.

News: international news from a wide variety of sources, and other matters of relevance to the journal's fields of study are invited. These should be 200-700 words in length and may be published at the Editor's discretion (online and/or in hard copy).

BEFORE YOU BEGIN

Ethics in publishing

For information on Ethics in publishing and Ethical guidelines for journal publication see <http://www.elsevier.com/publishingethics> and <http://www.elsevier.com/ethicalguidelines>.

Policy and ethics

The work described in your article must have been carried out in accordance with *The Code of Ethics of the World Medical Association (Declaration of Helsinki) for experiments involving humans* <http://www.wma.net/e/policy/b3.htm>; *EC Directive 86/609/EEC for animal experiments* http://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab_animals/legislation_en.htm; *Uniform Requirements for manuscripts submitted to Biomedical journals* <http://www.icmje.org>. This must be stated at an appropriate point in the article.

If the work involves chemicals, procedures or equipment that have any unusual hazards inherent in their use, the author must clearly identify these in the manuscript. If the work involves the use of animal or human subjects, the author should ensure that the manuscript contains a statement that all procedures were performed in compliance with relevant laws and institutional guidelines and that the appropriate institutional committee(s) have approved them. Authors should include a statement in the manuscript that informed consent was obtained for experimentation with human subjects and that permission was obtained from the local health authorities, ethical committee or internal review board depending on applicability. The privacy rights of human subjects must always be observed.

Conflict of interest

All authors are requested to disclose any actual or potential conflict of interest including any financial, personal or other relationships with other people or organizations within three years of beginning the submitted work that could inappropriately influence, or be perceived to influence, their work. See also <http://www.elsevier.com/conflictsofinterest>.

Author declaration

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere including electronically in the same form, in English or in any other language, without the written consent of the copyright-holder. It is mandatory for the submitting person to include an Author Declaration to this effect as part of the submission. The Author Declaration can be downloaded from the website at the time of submission.

Plagiarism and duplicate publication

The journal participates in the CrossCheck system which uses iThenticate software for the detection of similarities between submitted manuscripts and the published literature.

Authors are advised to consider the application of software programs which address the very sensitive issues of self-copying, repetition, duplicate publication and plagiarism.

Please see the Committee on Publication Ethics (COPE) website for definitions and further details.

Contributors

Submission of multi-authored manuscripts to this journal requires the consent of each author as stated in the Author Declaration. All authors and all contributors (including medical writers and editors) must specify their individual contributions at the end of the text. The following format is suggested: "I declare that I participated in the (here list contributions made to the study) and that I have seen and approved the final version. I have the following conflicts of interest" (list here all relevant conflicts and source of funding). This should be listed in the "Comments" field in EES.

Changes to authorship

This policy concerns the addition, deletion, or rearrangement of author names in the authorship of accepted manuscripts:

Before the accepted manuscript is published in an online issue: Requests to add or remove an author, or to rearrange the author names, must be sent to the Journal Manager from the corresponding author of the accepted manuscript and must include: (a) the reason the name should be added or removed, or the author names rearranged and (b) written confirmation (e-mail, fax, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed. Requests that are not sent by the corresponding author will be forwarded by the Journal Manager to the corresponding author, who must follow the procedure as described above. Note that: (1) Journal Managers will inform the Journal Editors of any such requests and (2) publication of the accepted manuscript in an online issue is suspended until authorship has been agreed.

After the accepted manuscript is published in an online issue: Any requests to add, delete, or rearrange author names in an article published in an online issue will follow the same policies as noted above and result in a corrigendum.

Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (for more information on this and copyright see <http://www.elsevier.com/copyright>). Acceptance of the agreement will ensure the widest possible dissemination of information. An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations (please consult <http://www.elsevier.com/permissions>). If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases: please consult <http://www.elsevier.com/permissions>.

Retained author rights

As an author you (or your employer or institution) retain certain rights; for details you are referred to: <http://www.elsevier.com/authorsrights>.

Role of the funding source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated. Please see <http://www.elsevier.com/funding>.

Funding body agreements and policies

Elsevier has established agreements and developed policies to allow authors whose articles appear in journals published by Elsevier, to comply with potential manuscript archiving requirements as specified as conditions of their grant awards. To learn more about existing agreements and policies please visit <http://www.elsevier.com/fundingbodies>.

Language and language services

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who require information about language editing and copyediting services pre- and post-submission please visit <http://webshop.elsevier.com/languageservices> or our customer support site at <http://support.elsevier.com> for more information.

Patient details

Unless you have written permission from the patient (or, where applicable, the next of kin), the personal details of any patient included in any part of the article and in any supplementary materials (including all illustrations and videos) must be removed before submission. For further information see <http://www.elsevier.com/patientphotographs>.

Submission

Submission to this journal proceeds totally online. Via the homepage of this journal, <http://ees.elsevier.com/rbmo>, you will be guided stepwise through the creation and uploading of the various files. Any queries concerning the submission/uploading process should be referred to the online support team at <http://epsupport.elsevier.com>. The system automatically converts source files to a single Adobe Acrobat PDF version of the article, which is used in the peer-review process. Please note that even though manuscript source files are converted to PDF at submission for the review process, these source files are needed for further processing after acceptance. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, takes place by e-mail and via the author's homepage, removing the need for a hard-copy paper trail.

Referees

To expedite the review process, authors are invited to provide the editorial office with the names and email addresses of 3 potential referees that are able to competently review the article submitted for possible publication. The referees are not to be associated with or involved with the article in any way or be from the same institution as the author(s) involved with the article, and preferably not resident in the same country.

PREPARATION

Use of wordprocessing software

It is important that the file be saved in the native format of the wordprocessor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the wordprocessor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier: <http://www.elsevier.com/guidepublication>). Note that source files of figures, tables and text graphics will be required whether or not you embed your figures in the text. See also the section on Electronic artwork.

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your wordprocessor.

Article structure

Title page

Title. Concise and informative (maximum 15 words). Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.

Author names and affiliations. Where the family name may be ambiguous (e.g., a double name), please indicate this clearly. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name, and, if available, the e-mail address of each author.

Corresponding author. Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that telephone and fax numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address.**

Present/permanent address. If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a "Present address" (or "Permanent address") may be indicated as an additional explanatory superscript to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such explanations.

Abstract

A concise and factual abstract is required, 200 words maximum in a single, continuous paragraph without subheadings. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separate from the article, so it must

be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, they must be cited in full, without reference to the reference list. Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using British spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, "and", "of"). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Summary

A summary for lay readers is required of 250 words maximum. This must be understandable to a wider lay public and to patients. This summary is available in a special section on the journal homepage. It can be based on the Abstract, but all complex terms must be described simply. The summary must be included at submission in a separate file.

Introduction

The Introduction should describe the question addressed by the report and must state the objective of the research. The literature review should be relevant but not detailed.

Materials and methods

The Materials and methods section should describe the research methodology in sufficient detail that others could reasonably be expected to be able to duplicate the work. However, if the methodology has been previously published, the appropriate reference should be cited, and a full description is not required. Methods of statistical analysis should be identified and, when appropriate, the basis for their selection stated. Statistical software programs used should be cited in the text and if not well known, a reference given to how they may be obtained (URL or supplier name and address). *P* values should be expressed to no more than three decimal places. Reports in which statistical difference is lacking must provide some indication of the study's power to detect such differences, and this information must be included in the abstract.

Where possible, live-birth data should be used as the primary outcome in the evaluation of any new protocol or equipment.

Results

The Results section should present the findings in appropriate detail. Tables and figures may be used, but duplication between text and tables or figures is to be avoided.

Discussion

The Discussion section should be used to critically appraise the implications of the findings and to compare them with those of other studies. Repetition of the results section should be avoided. The main conclusions of the study may be summarised in a paragraph at the end of the Discussion section.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proofreading the article, etc.).

Persons who have contributed intellectually to the paper but whose contributions do not justify authorship may be named and their function or contribution described, e.g. "scientific adviser," "data collections," or "participation in clinical trial." Such persons must have given their permission to be named. Authors are responsible for obtaining written permission from the persons acknowledged by name, because readers may infer their endorsement of the data and conclusions.

References

Authors are responsible for the accuracy of references. The 'Harvard' style is used. References appearing for the first time in a table or figure should be cited in the text where the table or figure is mentioned.

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). It is **not** recommended that references are cited in the abstract but if for some reason they must be, they must also be given in full in the reference list. Unpublished results are **not** recommended in the reference list but may be mentioned in the text. Exceptionally, if unpublished references are included in the reference list, they should follow the standard reference style of the journal and should include

a substitution of the publication date with "Unpublished results". Personal communications are **not** allowed in the reference list, but may be mentioned in the text where the name and brief address of the person must also be supplied. Citation of a reference as "in press" implies that the item has been accepted for publication.

Web references

As a minimum, the full URL should be given. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

Reference style

Text citations: All citations in the text should refer to:

1. *Single author:* the author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of publication;
2. *Two authors:* both authors' names and the year of publication;
3. *More than three authors:* first author's name followed by "et al." and the year of publication.

Citations may be made directly (or parenthetically). Groups of references should be listed first alphabetically, then chronologically.

Examples: "as demonstrated (Allan, 1996a, 1996b, 1999; Allan and Jones, 1995). Kramer et al. (2000) have recently shown"

Reference list: Please provide name and initial(s) for all authors, followed by year of publication. References should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters "a", "b", "c", etc., placed after the year of publication.

Examples:

Reference to a journal publication:

Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2000. The art of writing a scientific article. *J. Sci. Commun.* 163, 51–59.

Reference to a book:

Strunk Jr., W., White, E.B., 1979. *The Elements of Style*, third ed. Macmillan, New York.

Reference to a chapter in an edited book:

Mettam, G.R., Adams, L.B., 1999. How to prepare an electronic version of your article, in: Jones, B.S., Smith, R.Z. (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*. E-Publishing Inc., New York, pp. 281–304.

Journal abbreviations

Journal names should be abbreviated according to Index Medicus journal abbreviations: <http://www.nlm.nih.gov/tsd/serials/lji.html>

Abbreviations

Define abbreviations that are not standard in this field at first mention. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as at first mention in the text. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

Nomenclature and units

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other quantities are mentioned, give their equivalent in SI. You are urged to consult IUB: Biochemical Nomenclature and Related Documents: <http://www.chem.qmw.ac.uk/iubmb/> for further information.

Database linking

Elsevier aims at connecting online articles with external databases which are useful in their respective research communities. If your article contains relevant unique identifiers or accession numbers (bioinformatics) linking to information on entities (genes, proteins, diseases, etc.) or structures deposited in public databases, then please indicate those entities according to the standard explained below.

Authors should explicitly mention the *database abbreviation (as mentioned below) together with the actual database number*, bearing in mind that an error in a letter or number can result in a dead link in the online version of the article.

Please use the following format: **Database ID: xxxx**

Links can be provided in your online article to the following databases (examples of citations are given in parentheses):

- **ASTM:** ASTM Standards Database (ASTM ID: G63)
- **CCDC:** Cambridge Crystallographic Data Centre (CCDC ID: AI631510)

- **GenBank**: Genetic sequence database at the National Center for Biotechnology Information (NCBI) (GenBank ID: BA123456)
- **GEO**: Gene Expression Omnibus (GEO ID: GSE27196; GEO ID: GPL5366; GEO ID: GSM9853)
- **MI**: EMBL-EBI OLS Molecular Interaction Ontology (MI ID: 0218)
- **MINT**: Molecular INTERactions database (MINT ID: 6166710)
- **NCBI Taxonomy**: NCBI Taxonomy Browser (NCBI Taxonomy ID: 48184)
- **NCT**: ClinicalTrials.gov (NCT ID: NCT00222573)
- **OMIM**: Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM ID: 601240)
- **PDB**: Worldwide Protein Data Bank (PDB ID: 1TUP)
- **TAIR**: The Arabidopsis Information Resource database (TAIR ID: AT1G01020)
- **UniProt**: Universal Protein Resource Knowledgebase (UniProt ID: Q9H0H5)

Footnotes

Footnotes should NOT be used in the text of submissions to the main journal of *RBMO* Online. Footnotes are permitted sparingly in submissions to the *Ethics, Bioscience and Life* supplement to *RBMO* Online. If used, number them consecutively throughout the article, using superscript Arabic numbers. Many wordprocessors build footnotes into the text, and this feature may be used. Should this not be the case, indicate the position of footnotes in the text and present the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list. *Table footnotes* are permitted in all submissions. Indicate each footnote in a table with a superscript lowercase letter.

Artwork

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Save text in illustrations as "graphics" or enclose the font.
- Only use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times, Symbol.
- Do not use titles in illustrations; instead, provide information in the caption.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Produce images near to the desired size of the printed version.
- Photomicrographs must carry scale bars in case of resizing during the production process.
- Submit each figure as a separate file.

A detailed guide on electronic artwork is available on our website:

<http://www.elsevier.com/artworkinstructions>

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

Regardless of the application used, when your electronic artwork is finalised, please "save as" or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS: Vector drawings. Embed the font or save the text as "graphics".

TIFF: colour or grayscale photographs (halftones): always use a minimum of 300 dpi.

TIFF: Bitmapped line drawings: use a minimum of 1000 dpi.

TIFF: Combinations bitmapped line/half-tone (colour or grayscale): a minimum of 500 dpi is required.

DOC, XLS or PPT: If your electronic artwork is created in any of these Microsoft Office applications please supply "as is".

Please do not:

- Supply embedded graphics in your wordprocessor (spreadsheet, presentation) document;
- Supply files that are optimised for screen use (like GIF, BMP, PICT, WPG); the resolution is too low;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Colour artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF, EPS or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable colour figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in colour on the Web (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in colour in the printed version. **For colour reproduction in print, you will receive information regarding**

the costs from Elsevier after receipt of your accepted article. Please indicate your preference for colour in print or on the Web only. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Please note: Because of technical complications which can arise by converting colour figures to "gray scale" (for the printed version should you not opt for colour in print) please submit in addition usable black and white versions of all the colour illustrations.

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Tables

Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text. Place footnotes to tables below the table body and indicate them with superscript lowercase letters. Avoid vertical rules. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in tables do not duplicate results described elsewhere in the article.

Supplementary material

Elsevier accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please provide the data in one of our recommended file formats. Authors should submit the material in electronic format together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Submission checklist

It is hoped that this list will be useful when submitting your article. Please consult this Guide for Authors for further details of any item.

Ensure that the following items are present in your uploaded manuscript:

Title page: include title and list of authors in the correct order

One author designated as Corresponding Author:

- E-mail address
- Full postal address
- Telephone and fax numbers

All necessary files have been uploaded:

- Abstract (one single paragraph of not more than 200 words)
- Keywords
- All figure captions
- All tables (including title, description, footnotes)

Further considerations:

- Manuscript has been "spellchecked" and "grammar-checked"
- References are in the correct format for this journal
- All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Web)
- Colour figures are clearly marked as being intended for colour reproduction on the Web (free of charge) and in print or to be reproduced in colour on the Web (free of charge) and in black-and-white in print
- If only colour on the Web is required, black and white versions of the figures are also supplied for printing purposes

For any further information please visit our customer support site at <http://epsupport.elsevier.com>.

AFTER ACCEPTANCE

Use of the Digital Object Identifier

The Digital Object Identifier (DOI) may be used to cite and link to electronic documents. The DOI consists of a unique alpha-numeric character string which is assigned to a document by the publisher upon the initial electronic publication. The assigned DOI never changes. Therefore, it is an ideal

medium for citing a document, particularly 'Articles in press' because they have not yet received their full bibliographic information. The correct format for citing a DOI is shown as follows (example taken from a document in the journal *Physics Letters B*):

doi:10.1016/j.physletb.2010.09.059

When you use the DOI to create URL hyperlinks to documents on the web, the DOIs are guaranteed never to change.

Proofs

One set of page proofs (as PDF files) will be sent by e-mail to the corresponding author (if we do not have an e-mail address then paper proofs will be sent by post) or, a link will be provided in the e-mail so that authors can download the files themselves. Elsevier now provides authors with PDF proofs which can be annotated; for this you will need to download Adobe Reader version 7 (or higher) available free from <http://www.adobe.com/products/acrobat/readstep2.html>. Instructions on how to annotate PDF files will accompany the proofs (also given online). The exact system requirements are given at the Adobe site: <http://www.adobe.com/products/acrobat/acrrsystemreqs.html#70win>.

If you do not wish to use the PDF annotations function, you may list the corrections (including replies to the Query Form) and return them to Elsevier in an e-mail. Please list your corrections quoting line number. If, for any reason, this is not possible, then mark the corrections and any other comments (including replies to the Query Form) on a printout of your proof and return by fax, or scan the pages and e-mail, or by post. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. No additional author names will be allowed, nor can any author names be removed. We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Therefore, it is important to ensure that all of your corrections are sent back to us in one communication: please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility. Note that Elsevier may proceed with the publication of your article if no response is received.

Offprints

The corresponding author, at no cost, will be provided with a PDF file of the article via e-mail. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. The PDF file is a watermarked version of the published article and includes a cover sheet with the journal cover image and a disclaimer outlining the terms and conditions of use.

AUTHOR INQUIRIES

For inquiries relating to the submission of articles (including electronic submission where available) please visit this journal's homepage. You can track accepted articles at <http://www.elsevier.com/trackarticle> and set up e-mail alerts to inform you of when an article's status has changed. Also accessible from here is information on copyright, frequently asked questions and more. Contact details for questions arising after acceptance of an article, especially those relating to proofs, will be provided by the publisher.

© Copyright 2012 Elsevier | <http://www.elsevier.com>