

Influência do período de abstinência sexual sobre as características seminais de homens inférteis

Influence of abstinence period on seminal characteristics in infertile men

Fábio Firmbach Pasqualotto¹, Gabriela Pogliá Fonseca², Matheus Luís da Silva², Ramon Venzon Ferreira², Bibiana Elisa Zago³, Cláudio Garbin Júnior³, Eleonora Bedin Pasqualotto⁴

RESUMO

Objetivo: avaliar a influência do período de abstinência sexual sobre os parâmetros espermáticos em homens inférteis, assim como determinar a melhora na qualidade seminal após mistura dos ejaculados. **Métodos:** estudo retrospectivo no qual se avaliou um grupo de 88 homens com oligozoospermia (n=25), astenozoospermia (n=43) ou oligoastenozoospermia (n=20), cujas parceiras foram submetidas à inseminação intra-uterina entre setembro de 2002 e dezembro de 2004. Foram excluídos da análise casais nos quais os homens apresentavam análise seminal normal ou mulheres com alterações sugestivas de infertilidade. Cada homem produziu duas amostras seminais em período curto de tempo (30 minutos a 1 hora). Foram avaliados o volume seminal, a concentração total de espermatozoides móveis e o percentual de motilidade espermática. Para todos os parâmetros avaliados foram comparadas a primeira e a segunda amostra seminal coletadas. Além disso, a concentração total de espermatozoides móveis foi comparada entre a primeira amostra coletada e a união das amostras. A avaliação estatística foi realizada usando o teste t e o teste χ^2 . **Resultados:** em homens oligozoospermicos não houve diferença nas características seminais entre a primeira e a segunda amostra seminal (p>0,05). A concentração total de espermatozoides móveis aumentou significativamente na segunda amostra em comparação à primeira amostra em homens astenozoospermicos (42,4±6,8 vs 51,5±7,2x10⁶ espermatozoides/mL) e oligoastenozoospermicos (11,1±7,4 vs 14,35±7,2x10⁶ espermatozoides/mL) (p<0,05). A união dos dois ejaculados aumentou a concentração total de espermatozoides móveis em comparação à primeira amostra (p<0,05) nos homens oligozoospermicos, astenozoospermicos e oligoastenozoospermicos em 110,5, 110,3 e 136,03%, respectivamente. **Conclusões:** menor período de abstinência está associado a melhora da motilidade em homens inférteis. A união das amostras seminais constitui alternativa para aumentar a concentração total de espermatozoides móveis neste grupo de pacientes que desejam participar de inseminação intra-uterina ao invés da fertilização *in vitro*.

PALAVRAS-CHAVE: Abstinência sexual; Infertilidade masculina; Sêmen; Oligoespermia; Espermatozoides

ABSTRACT

Purpose: to evaluate the influence of abstinence period on seminal characteristics in infertile men and to establish a better seminal quality after pooling the samples. **Methods:** a retrospective study was performed on 88 oligozoospermic (n=25), asthenozoospermic (n=43), and oligoasthenozoospermic (n=20) men whose partners underwent intrauterine insemination between September 2002 and December 2004. We excluded men with a normal semen analysis or women with abnormalities suggestive of infertility. Each man produced two semen samples in a short period of time (30 min to 1 h). We evaluated semen volume, total motile sperm count and percentage sperm motility. Comparisons were made between the first and second semen samples. After pooling the samples, we compared the total motile sperm count between the first sample and the pooled samples. Statistical evaluation was performed by Student's *t* test and the χ^2 test. **Results:** in oligozoospermic men, there were no differences in the semen characteristics between the first and the second seminal samples (p>0.05). The total motile sperm count increased significantly in the second sample in comparison to the first sample in asthenozoospermic (42.4±6.8 vs 51.5±7.2x10⁶ sperm/mL) and oligoasthenozoospermic men (11.1±7.4 vs 14.35±7.2x10⁶ sperm/mL) (p<0.05). The

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade de Caxias do Sul - UCS - Caxias do Sul (RS), Brasil

1 Professor Doutor Titular de Urologia e Embriologia da Faculdade de Medicina da Universidade de Caxias do Sul - UCS - Caxias do Sul (RS), Brasil.

2 Acadêmicos do Curso de Medicina da Universidade de Caxias do Sul - UCS - Caxias do Sul (RS), Brasil.

3 Acadêmicos do Curso de Medicina da Universidade de Caxias do Sul - UCS - Caxias do Sul (RS), Brasil.

4 Professora Doutora Titular de Ginecologia e Obstetria da Faculdade de Medicina da Universidade de Caxias do Sul - UCS - Caxias do Sul (RS), Brasil.

Correspondência: Fábio Firmbach Pasqualotto

Rua Pinheiro Machado, 2569, sl 23/24 - Bairro São Pelegrino - 95020-172 - Caxias do Sul - RS - e-mail: Fabio@conception-rs.com.br

Recebido em: 28/12/2005

Aceito com modificações em: 30/1/2006

pool of two ejaculates increased the total motile sperm count in comparison to the first sample ($p < 0.05$) in oligozoospermic, asthenozoospermic and oligoasthenozoospermic men by 110.5, 110.3 and 136.03%, respectively. **Conclusions:** a short period of abstinence is associated with higher sperm motility in infertile men. The pool of two semen samples is a way to increase the total motile sperm count in this group of patients whose wives want to undergo an intrauterine insemination instead of *in vitro* fertilization.

KEYWORDS: Sexual abstinence; Infertility, male; Semen; Oligospermia; Spermatozoa

Introdução

Na maioria dos países desenvolvidos, a média de idade dos pais tem aumentado e uma grande parcela de homens tem iniciado a sua prole após os 50 anos de idade¹. Esta tendência deve-se ao fato de que as mulheres estão demorando muito para tomar a decisão de ter o primeiro filho em idade na qual já inicia o declínio de sua fertilidade. Apesar de ainda não estar bem definida a influência da idade na qualidade seminal, estudo recente demonstrou que existe piora na concentração e na morfologia espermática após os 45 anos de idade².

A variação na qualidade seminal em face fatores individuais e ambientais já foi bem estabelecida pela experiência clínica e por diversos estudos, sendo o período de abstinência sexual um dos fatores responsáveis por mudanças nas características seminais^{3,4}. Estudo realizado na Dinamarca em 2004 demonstrou existir aumento de 25,2% ao dia na concentração espermática e de 9,5% ao dia no volume seminal nos primeiros quatro dias de abstinência³. Além disso, não houve alteração na motilidade e morfologia dos espermatozoides com relação à duração da abstinência. Já outros autores observaram importante decréscimo da motilidade com o aumento do período de abstinência após 5 dias^{5,6}.

Na tentativa de minimizar esta variação, a maioria dos profissionais seguem as diretrizes estabelecidas pela Organização Mundial de Saúde (OMS), que recomenda um período de abstinência entre dois e cinco dias para a avaliação dos parâmetros seminais. Porém, estas recomendações não são baseadas em evidências sólidas na literatura para comprovar sua relevância estatística⁷.

Um grande número de tratamentos para infertilidade está disponível atualmente, entre estes a inseminação intra-uterina (IIU) com ou sem indução da ovulação e a fertilização *in vitro* (FIV) com ou sem micromanipulação. A qualidade seminal tem grande importância para a escolha da técnica de reprodução assistida a ser utilizada⁸. Pacientes com concentração espermática inferior

a 5×10^6 espermatozoides/mL após processamento seminal têm indicação de FIV, já que pacientes com estes parâmetros seminais possuem baixas taxas de gravidez com outros métodos de tratamento para infertilidade⁹. Porém, o tratamento de escolha em pacientes que apresentem fator masculino leve a moderado é a IIU¹⁰, método este mais simples e econômico que a FIV. Em virtude do fato de que na maioria dos hospitais brasileiros não se realizam procedimentos de FIV gratuitos para a população, é importante realizarmos tratamentos que resultem em diminuição dos gastos a serem feitos pelos pacientes.

O objetivo deste estudo foi avaliar os parâmetros espermáticos em homens inférteis ao diminuir o período de abstinência entre duas amostras seminais e ao se juntarem estes ejaculados.

Métodos

Este estudo prospectivo foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Universidade de Caxias do Sul e todos os participantes do estudo assinaram termo de consentimento informado. No período de setembro de 2002 a dezembro de 2004, 326 homens procuraram o serviço para investigação da infertilidade masculina. Destes 326 homens, 218 apresentaram alteração seminal (61 com oligozoospermia, 43 com astenozoospermia, 53 com teratozoospermia, 41 com oligoastenozoospermia e 20 com oligoastenoteratozoospermia). Destes, 88 casais cujos homens apresentavam oligozoospermia ($n=25$), astenozoospermia ($n=43$) ou oligoastenozoospermia ($n=20$) foram submetidos ao tratamento de infertilidade conjugal por meio da inseminação intra-uterina e foram incluídos no estudo. Os pacientes com análise seminal normal (108 homens) e aqueles pacientes que foram submetidos à FIV ou que não desejaram realizar tratamento com IIU foram excluídos do estudo. Além disso, as mulheres com alterações sugestivas de infertilidade feminina foram, também, excluídas do estudo.

Os pacientes foram encaminhados para investigação de infertilidade por ginecologistas,

urologistas ou procura espontânea. A avaliação dos pacientes foi realizada por um urologista especialista em infertilidade masculina (FFP). Todas as parceiras foram investigadas quanto à infertilidade feminina por uma ginecologista especialista em reprodução humana (EBP) por meio do exame físico, exames hormonais, ultra-sonografia e histerosalpingografia, não sendo detectadas alterações.

Os 88 pacientes foram orientados a coletar suas amostras seminais por masturbação dentro de recipiente plástico estéril. As amostras foram submetidas à liquefação a 37°C por 30 minutos, sendo avaliados os seguintes parâmetros seminais: volume seminal, percentual de motilidade espermática e concentração total de espermatozoides móveis. O volume do ejaculado foi medido por aspiração de toda a amostra com o auxílio de uma pipeta graduada acoplada a um pipetador eletrônico. Após misturar cuidadosamente a amostra seminal por completo, com o auxílio de aparelho misturador de amostras, as mesmas foram avaliadas manualmente pelo pesquisador. Para cada mensuração, uma alíquota liquefeita de 5 µL foi inserida em uma câmara de contagem Microcell, descartável e com 20 µm de profundidade, até seu preenchimento integral, com o auxílio de pipeta de pressão positiva para determinação da concentração e motilidade espermáticas. Estas foram analisadas manualmente com o uso de microscópio óptico equipado com objetiva de contraste de fase de 20X e aumento de 200X.

No dia da IIU, cada homem produziu duas amostras seminais em um período curto de tempo (entre 30 minutos e uma hora). Comparações foram feitas entre a primeira e a segunda amostra coletada, assim como o percentual de melhora na concentração total de espermatozoides móveis após se juntarem as duas amostras coletadas com relação à primeira amostra seminal.

As parceiras dos pacientes foram submetidas à indução da ovulação com hormônio folículo-estimulante recombinante (FSHr) diariamente na dose inicial de 50 a 100 UI/dia, subcutâneo, iniciando-se no segundo ou terceiro dia do ciclo menstrual. A monitorização da indução da ovulação foi feita pela ultra-sonografia transvaginal seriada com transdutor de 5 MHz, sendo o primeiro exame realizado antes de iniciar o estímulo (ultra-sonografia basal) e o segundo no quinto dia de estímulo. A partir do quinto dia de estímulo, o controle ultra-sonográfico foi realizado a cada dois dias e a dose de gonadotrofina administrada foi ajustada de acordo com a medida e quantidade dos folículos. Quando pelo menos um folículo atingiu 20 mm de diâmetro médio, cinco mil unidades de

gonadotrofina coriônica humana (hCG) foram administradas por via intramuscular. A IIU foi realizada 36 horas após a injeção de hCG. O ciclo foi cancelado quando a ultra-sonografia revelou, no momento da administração do hCG, um número de cinco ou mais folículos com diâmetro superior a 16 mm, para evitar gestação múltipla e os riscos inerentes a esta. O diagnóstico da gestação foi realizado por exame plasmático de beta-hCG a partir de 14 dias da realização da IIU, em casos nos quais não ocorreu a menstruação.

O teste *t* de Student e o teste do χ^2 foram utilizados para comparar as médias de motilidade, concentração total de espermatozoides móveis e volume seminal entre a primeira e segunda coleta no mesmo paciente. O teste *t* de Student (dados paramétricos) foi utilizado para comparar as médias das variáveis examinadas e o teste do χ^2 para comparar as taxas percentuais de aumento nas variáveis examinadas. O nível de diferença estatística estabelecido foi 5%. A informação foi analisada pelo programa Statistical Package for Social Sciences, SPSS, versão 11.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, EUA).

Resultados

Em homens oligozoospermicos, as características seminais da primeira e da segunda amostras foram similares (12,4±3,5 vs. 13,5±3,1x10⁶±3,1 espermatozoides/mL; p=0,13) (Tabela 1). Da mesma maneira, detectamos leve diminuição no volume seminal (2,9±0,8 e 2,6±0,9 mL; p=0,17) e aumento na concentração de espermatozoides móveis na segunda amostra, apesar de não se alcançar diferença significativa (7,6±3,9 vs 8,9±3,6x10⁶ espermatozoides/mL; p=0,08) Além disso, não houve melhora na motilidade espermática (57,4±6,5 e 64,9±8,5% de espermatozoides móveis; p=0,07).

Tabela 1 - Variáveis relacionadas à qualidade seminal analisadas em homens oligozoospermicos.

Variáveis	Primeira amostra	Segunda amostra	Valor de p
Volume seminal (mL)	2,9 ± 0,8	2,6 ± 0,9	0,17
Concentração (x10 ⁶ espermatozoides/mL)	12,4 ± 3,5	13,5 ± 3,1	0,13
Motilidade (%)	57,4 ± 6,5	64,9 ± 8,5	0,07
Concentração total de espermatozoides móveis (x10 ⁶ espermatozoides/mL)	7,6 ± 3,9	8,9 ± 3,6	0,08

p < 0,05 foi considerado estatisticamente significativo.

Em homens astenozoospermicos (n=43), a motilidade e a concentração total de espermatozoides móveis aumentaram significativamente ($p < 0,01$) na segunda amostra ($34,8 \pm 5,6$ vs $47,3 \pm 6,1\%$ e $42,4 \pm 6,8$ vs $51,5 \pm 7,2 \times 10^6$ espermatozoides/mL); respectivamente (Tabela 2). Decréscimo no volume seminal, porém não significativo, também foi detectado neste grupo ($2,7 \pm 0,7$ e $2,5 \pm 0,6$ mL; $p = 0,21$).

Tabela 2 - Variáveis relacionadas à qualidade seminal analisadas em homens astenozoospermicos.

Variáveis	Primeira amostra	Segunda amostra	Valor de p
Volume seminal (mL)	$2,7 \pm 0,7$	$2,5 \pm 0,6$	0,21
Concentração ($\times 10^6$ espermatozoides/mL)	$36,85 \pm 12,4$	$42,55 \pm 9,7$	0,06
Motilidade (%)	$34,8 \pm 5,6$	$47,3 \pm 6,1$	0,03
Concentração total de espermatozoides móveis ($\times 10^6$ espermatozoides/mL)	$42,4 \pm 6,8$	$51,5 \pm 7,2$	0,04

$p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

A motilidade e a concentração total de espermatozoides móveis aumentaram significativamente ($p < 0,01$) na segunda amostra ($32,3 \pm 4,2$ vs $44,3 \pm 7,2\%$ e $11,1 \pm 7,4$ vs $14,35 \pm 7,2 \times 10^6$ espermatozoides/mL), respectivamente, no grupo de pacientes oligoastenozoospermicos (n=20) (Tabela 3).

Tabela 3 - Variáveis relacionadas à qualidade seminal analisadas em homens oligoastenozoospermicos.

Variáveis	Primeira amostra	Segunda amostra	Valor de p
Volume seminal (mL)	$2,8 \pm 0,5$	$2,7 \pm 0,8$	0,09
Concentração ($\times 10^6$ espermatozoides/mL)	$9,01 \pm 2,1$	$15,6 \pm 2,5$	0,06
Motilidade (%)	$32,3 \pm 4,2$	$44,3\% \pm 7,2$	0,04
Concentração total de espermatozoides móveis ($\times 10^6$ espermatozoides/mL)	$11,1 \pm 7,4$	$14,35 \pm 7,2$	0,03

$p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

A união dos dois ejaculados aumentou a concentração total de espermatozoides móveis em comparação à primeira amostra ($p < 0,05$) nos homens oligoospermicos, astenoospermicos e oligoastenoospermicos em 110,5, 110,3 e 136,03%, respectivamente (Tabela 4).

Tabela 4 - Concentração total de espermatozoides móveis da primeira amostra e após a mistura dos ejaculados.

Parâmetros seminais	Primeira amostra	União dos ejaculados	Porcentagem de melhora (%)	Valor de p
Oligozoospermia	$7,6 \pm 3,9$	$16,1 \pm 1,2$	110,5	0,03
Astenoospermia	$42,4 \pm 6,8$	$89,2 \pm 8,1$	110,3	0,03
Oligoastenoospermia	$11,1 \pm 7,4$	$26,2 \pm 8,6$	136,03	0,02

$p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

Discussão

Nas últimas décadas, foi identificado declínio na qualidade do sêmen de homens normais. Uma análise de 61 estudos revelou declínio na concentração espermática e no volume seminal no período entre 1938 e 1990¹¹. Outro estudo também demonstrou menor concentração espermática assim como redução na motilidade e no número de espermatozoides morfolologicamente normais entre 1973 e 1992 em homens férteis⁵. Embora a idade masculina afete a probabilidade de engravidar suas parceiras, anormalidades nos cromossomos dos espermatozoides e em alguns componentes da análise seminal são de importância inferior quando comparadas à frequência das ejaculações¹.

Da mesma maneira, o número de mulheres inférteis aumentou nos últimos 20 anos diante do adiamento na constituição familiar e concepção, levando a maior procura por tratamentos para infertilidade¹². De fato, houve grande tendência nestes últimos anos de as mulheres terem o seu primeiro filho quando a capacidade reprodutiva começa a diminuir¹. Esta tendência estimulou o interesse de estudiosos a pesquisar os fatores associados ao declínio na fertilidade feminina. Atualmente sabemos que a qualidade oocitária diminui, ao menos parcialmente, devido ao aumento nas taxas de aneuploidia. O declínio da fertilidade torna-se clinicamente relevante quando a mulher chega aos 35 anos de idade, e mesmo os tratamentos de reprodução assistida não conseguem compensar este declínio causado pela idade.

Vários fatores mostram influência nos parâmetros seminais como fumo, café, agrotóxicos e período de abstinência sexual⁶. Com relação ao período de abstinência sexual, são observadas diferenças importantes entre populações de pacientes férteis ou inférteis^{13,14}. Estudo recente demonstra que períodos de abstinência sexual superiores a 3 dias diminuem as chances de um casal conseguir engravidar por meio de inseminação intra-uterina, provavelmente decorrente da perda da

viabilidade espermática ou por fatores não observados na análise seminal de rotina¹⁵. Avaliando o sêmen de homens normozoospermicos, observa-se que, com o aumento do período de abstinência, ocorre incremento na concentração espermática e no volume seminal, porém a qualidade espermática sofre deterioração, havendo diminuição da motilidade e do número de espermatozoides morfolologicamente normais^{3,5,6,8,16,17}.

Por outro lado, em pacientes oligozoospermicos, os parâmetros seminais sofrem diminuição da motilidade e morfologia espermática com o aumento da duração da abstinência^{6,17}. Evitar abstinência sexual ou realizar abstinência de apenas um dia em homens oligozoospermicos é recomendável com o objetivo de alcançar a melhor qualidade seminal, visto que a morfologia espermática apresenta piora após o primeiro dia de abstinência sexual⁶.

Acredita-se que a motilidade espermática seja um dos parâmetros seminais com maior impacto sobre a fertilidade, sendo que a baixa motilidade está relacionada com maior dificuldade de concepção tanto espontaneamente como com o auxílio da inseminação intra-uterina^{6,16}. Várias explicações fisiopatológicas foram elaboradas para esclarecer as diferenças entre populações férteis e inférteis em face do período de abstinência. A primeira justificativa para estes achados foi a importância do epidídimo e das glândulas sexuais acessórias influenciando o status funcional dos gametas masculinos^{6,18,19}. É de conhecimento geral que, após a espermatogênese, ocorre uma fase de maturação dos espermatozoides na cauda do epidídimo onde estes permanecem imóveis até o momento da ejaculação²⁰. O trânsito pelo epidídimo é influenciado por fatores externos como o estímulo sexual e a frequência ejaculatória, os quais aumentam a velocidade da passagem dos espermatozoides. A motilidade então é induzida quando o ejaculado se junta às secreções das glândulas sexuais acessórias⁶.

A diminuição das taxas de produção espermática não reduz o número de espermatozoides no epidídimo²¹. Porém, o tempo de transporte dos espermatozoides no epidídimo é três vezes maior em oligozoospermicos quando comparados aos normozoospermicos, levando a deterioração da qualidade seminal. A senescência espermática causa decréscimo no percentual de espermatozoides morfolologicamente normais, havendo, conseqüentemente, prejuízo na motilidade total. Este fenômeno é mais evidente quanto maior for o período de abstinência^{6,22}.

Um aumento nos níveis de espécies reativas de oxigênio em pacientes inférteis foi encontrado

ao se compararem as amostras seminais de homens férteis e de pacientes azoospermicos²³. Esta pode ser uma das razões para a rápida deterioração da motilidade e morfologia espermática em um período de abstinência mais prolongado nestes pacientes. A qualidade seminal sofre piora importante com o aumento nos níveis de espécies reativas de oxigênio no sêmen^{24,25}.

Em estudo realizado em Israel, amostras seminais de ejaculados seqüenciais foram reunidas, observando-se resultados surpreendentes: a motilidade aumentou 49% com relação à primeira amostra em normozoospermicos, 95% em astenoospermicos, 67 e 75% em oligozoospermicos e 233 e 139% em oligoastenoospermicos²⁶. Desta forma, usando metodologia semelhante à nossa, os autores mostraram também aumento na qualidade seminal do segundo ejaculado comparado ao primeiro. Outro estudo, no qual se compararam amostras seminais de pacientes oligozoospermicos com intervalo de uma a quatro horas, demonstrou aumento na concentração total de espermatozoides móveis na segunda amostra em comparação à primeira⁹. Os mesmos autores demonstraram melhora de 329% na concentração total de espermatozoides móveis quando foram unidas as duas amostras seminais com intervalo de até quatro horas comparado à primeira amostra seminal.

Os resultados deste estudo são de extrema importância para serem utilizados em casais nos quais o fator masculino é o causador da infertilidade. Homens oligozoospermicos podem aumentar suas chances de fertilidade tendo relação sexual todos os dias no período ovulatório, assim como a união dos ejaculados se mostra um método simples e com um custo mais acessível a fim de aumentar a motilidade total para inseminação intrauterina, entre outros tratamentos de reprodução assistida.

Referências

1. Baird DT, Collins J, Egozcue J, Eyers LH, Gianaroli L, Leridon H, et al. Fertility and ageing. Hum Reprod Update. 2005;11(3):261-76.
2. Pasqualotto FF, Sobreiro BP, Hallak J, Pasqualotto EB, Lucon AM. Sperm concentration and normal sperm morphology decrease and follicle-stimulating hormone level increases with age. BJU Int. 2005;96(7):1087-91.
3. Carlsen E, Petersen JH, Andersson AM, Skakkebaek NE. Effects of ejaculatory frequency and season on variations in semen quality. Fertil Steril. 2004;82(2):358-66.

4. Makkar G, Ng EH, Yeung WS, Ho PC. A comparative study of raw and prepared semen samples from two consecutive days. *J Reprod Med*. 2001;46(6):565-72.
5. Auger J, Kunstmann JM, Czyglik F, Jouannet P. Decline in semen quality among fertile men in Paris during the past 20 years. *N Engl J Med*. 1995;332(5):281-5.
6. Elzanazy S, Malm J, Giwercman A. Duration of sexual abstinence: epididymal and accessory sex gland secretions and their relationship to sperm motility. *Hum Reprod*. 2005;20(1):221-25.
7. Pasqualotto FF, Sobreiro BP, Hallak J, Athayde KS, Pasqualotto EB, Lucon AM. High percentage of abnormal semen parameters in a pre-vasectomy population. *Fertil Steril*. In press 2006.
8. Levitas E, Lunenfeld E, Weiss N, Friger M, Har-Vardi I, Koifman A, et al. Relationship between the duration of sexual abstinence and semen quality: analysis of 9,489 semen samples. *Fertil Steril*. 2005;83(6):1680-6.
9. Tur-Kaspa I, Dudkiewicz A, Confino E, Gleicher N. Pooled sequential ejaculates: a way to increase the total number of motile sperm from oligozoospermic men. *Fertil Steril*. 1990;54(5):906-9.
10. Garceau L, Henderson J, Davis LJ, Petrou S, Henderson LR, McVeigh E, et al. Economic implications of assisted reproductive techniques: a systematic review. *Hum Reprod*. 2002;17(12):3090-109.
11. Carlsen E, Giwercman A, Keiding N, Skakkebaek NE. Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years. *BMJ*. 1992;305(6854):609-13.
12. Stephen EH, Chandra A. Update projection of infertility in the United States: 1995-2025. *Fertil Steril*. 1998;70(1):30-4.
13. De Jonge C, LaFromboise M, Bosmans E, Ombelet W, Cox A, Nijs M. Influence of the abstinence period on human sperm quality. *Fertil Steril*. 2004;82(1):57-65.
14. Kunzle R, Mueller MD, Huber AW, Drescher H, Bersinger NA. Seasonality in human semen quality of smokers and non-smokers: effect of temperature. *Asian J Androl*. 2004;6(3):243-7.
15. Jurema MW, Vieira AD, Bankowski B, Petrella C, Zhao Y, Wallach E, et al. Effect of ejaculatory abstinence period on the pregnancy rate after intrauterine insemination. *Fertil Steril*. 2005;84(3):678-81.
16. Cagnacci A, Maxia N, Volpe A. Diurnal variation of semen quality in human males. *Hum Reprod*. 1999;14(1):106-9.
17. Matilsky M, Battino S, Ben-Ami M, Geslevich Y, Eyali V, Shalev E. The effect of ejaculatory frequency on semen characteristics of normozoospermic and oligozoospermic men from an infertile population. *Hum Reprod*. 1993;8(1):71-3.
18. Elzanaty S, Richthoff J, Malm J, Giwercman A. The impact of epididymal and accessory sex gland function on sperm motility. *Hum Reprod*. 2002;17(11):2904-11.
19. Gonzales GF, Kortebani G, Mazzolli AB. Leukocytospermia and function of the seminal vesicles on seminal quality. *Fertil Steril*. 1992;57(5):1058-65.
20. Eddy EM, O'Brien DA. The spermatozoon. In: Knobil E, Neill JD, editors. *The physiology of reproduction*. 2nd ed. New York: Raven Press; 1994. p. 29-77.
21. Johnson L, Varner DD. Effect of daily spermatozoan production but not age of transit time of spermatozoa through the human epididymis. *Biol Reprod*. 1988;39(4):812-7.
22. Rolf C, Cooper TG, Yeung CH, Nieschlag E. 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*. 1999;14(4):1028-33.
23. Pasqualotto FF, Sharma RK, Nelson DR, Thomas AJ, Agarwal A. Relationship between oxidative stress, semen characteristics, and clinical diagnosis in men undergoing infertility investigation. *Fertil Steril*. 2000;73(3):459-64.
24. Alkan I, Simsek F, Haklar G, Kervancioglu E, Ozveri H, Yalcin S, et al. Reactive oxygen species production by the spermatozoa of patients with idiopathic infertility: relationship to seminal plasma antioxidants. *J Urol*. 1997;157(1):140-3.
25. Pasqualotto FF, Silva CO, Umezu FM, Pasqualotto EB, Salvador M, Agarwal A. Relationship between sexual abstinence period and oxidative stress in infertile men. *Fertil Steril*. 2005;84 Suppl 1:S458.
26. Tur-Kaspa I, Maor Y, Levran D, Yonish M, Mashiach S, Dor J. How often should infertile men have intercourse to achieve conception? *Fertil Steril*. 1994;62(2):370-5.