



REVISTA BRASILEIRA DE REUMATOLOGIA

www.reumatologia.com.br



Artigo original

O ozônio diminui a qualidade do sêmen em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico



Juliana Farhat^a, Sylvia Costa Lima Farhat^a, Alfésio Luís Ferreira Braga^{a,b},
Marcello Cocuzza^c, Eduardo Ferreira Borba^d, Eloisa Bonfá^d e Clovis Artur Silva^{d,e,*}

^a Grupo de Estudos de Epidemiologia Ambiental, Laboratório de Poluição Atmosférica Experimental, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil

^b Grupo de Estudos de Exposição Ambiental e Avaliação de Riscos, Programa de Pós-Graduação de Saúde Coletiva, Universidade Católica de Santos, Santos, SP, Brasil

^c Divisão de Urologia, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil

^d Divisão de Reumatologia, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil

^e Unidade de Reumatologia Pediátrica, Instituto da Criança, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil

INFORMAÇÕES SOBRE O ARTIGO

Histórico do artigo:

Recebido em 3 de novembro de 2014

Aceito em 6 de julho de 2015

On-line em 1 de agosto de 2015

Palavras-chave:

Lúpus eritematoso sistêmico

Poluição do ar

Qualidade do sêmen

Fertilidade

Ciclofosfamida

R E S U M O

Objetivo: Investigar os efeitos deletérios da exposição aos poluentes do ar na Região Metropolitana de São Paulo sobre a qualidade do sêmen de pacientes com lúpus eritematoso sistêmico (LES).

Métodos: Foi feito um estudo longitudinal de painel com medidas repetidas de sete anos no Laboratório de Poluição Atmosférica Experimental e Reumatologia. Foram analisadas duas amostras de sêmen de 28 pacientes com LES pós-púberes. Foram avaliadas as concentrações diárias de exposição aos poluentes do ar PM₁₀, SO₂, NO₂, ozônio e CO e variáveis meteorológicas 90 dias antes de cada data de coleta de sêmen com o uso do método de equações de estimativas generalizadas.

Resultados: A ciclofosfamida intravenosa (CICIV) e o ozônio estiveram associados a uma diminuição na qualidade do sêmen dos pacientes com LES. A CICIV esteve associada a um decréscimo de 64,3 milhões de espermatozoides/mL (IC 95% 39,01-89,65; p=0,0001) e 149,14 milhões de espermatozoides/ejaculado (IC 95% 81,93-216,38; p=0,017). Em relação ao ozônio, os efeitos adversos mais relevantes foram observados entre os lags (intervalo de tempo) 80 e 88, quando a exposição a uma concentração média de ozônio um intervalo interquartil maior em nove dias móveis levou a um decréscimo de 22,9 milhões de espermatozoides/mL (IC 95% 5,8-40; p=0,009) e 70,5 milhões de espermatozoides/ejaculado (IC 95% 12,3-128,7; p=0,016). Uma análise mais aprofundada dos 17 pacientes que nunca usaram CICIV mostrou associação entre a exposição ao ozônio (80-88 dias) e o decréscimo de 30 milhões de espermatozoides/mL (IC 95% 7-53; p=0,011) e 79 milhões de espermatozoides/ejaculado (IC 95% 2,1-155,9; p=0,044).

Conclusão: O ozônio e a CICIV tiveram um efeito adverso consistente sobre a qualidade do sêmen de pacientes com LES durante a espermatogênese. Deve-se considerar a minimização

* Autor para correspondência.

E-mail: clovis.silva@hc.fm.usp.br (C.A. Silva).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.rbr.2015.07.002>

0482-5004/© 2015 Elsevier Editora Ltda. Todos os direitos reservados.

à poluição do ar, especialmente para pacientes com doenças inflamatórias sistêmicas crônicas que vivem nas grandes cidades.

© 2015 Elsevier Editora Ltda. Todos os direitos reservados.

Ozone decreases sperm quality in systemic lupus erythematosus patients

A B S T R A C T

Keywords:

Systemic lupus erythematosus

Air pollution

Sperm quality

Fertility

Cyclophosphamide

Objective: To investigate the deleterious effects of air pollutants exposure in the Sao Paulo metropolitan region on semen quality in systemic lupus erythematosus (SLE).

Methods: A seven-years longitudinal repeated-measures panel study was performed at Laboratory of Experimental Air Pollution and Rheumatology Division. Two semen samples from 28 post-pubertal SLE patients were analyzed. Daily concentrations of air pollutants exposure: PM₁₀, SO₂, NO₂, ozone, CO, and meteorological variables were evaluated on 90 days before each semen collection dates using generalized estimating equation models.

Results: Intravenous cyclophosphamide (IVCYC) and ozone had an association with a decrease in sperm quality of SLE patients. IVCYC was associated with decreases of 64.3 million of spermatozoa/mL (95%CI 39.01-89.65; p = 0.0001) and 149.14 million of spermatozoa/ejaculate (95%CI 81.93-216.38; p = 0.017). With regard to ozone, the most relevant adverse effects were observed from lags 80 to 88, when the exposure to an interquartile range increase in ozone 9-day moving average concentration led to decreases of 22.9 million of spermatozoa/mL (95%CI 5.8-40.0; p = 0.009) and 70.5 million of spermatozoa/ejaculate (95%CI 12.3-128.7; p = 0.016). Further analysis of 17 patients that never used IVCYC showed association between exposure to ozone (80-88 days) and decrease of 30.0 million of spermatozoa/mL (95%CI 7.0-53.0; p = 0.011) and 79.0 million of spermatozoa/ejaculate (95%CI 2.1-155.9; p = 0.044).

Conclusion: Ozone and IVCYC had a consistent adverse effect on semen quality of SLE patients during spermatogenesis. Minimizing exposure to air pollution should be taken into account, especially for patients with chronic systemic inflammatory diseases living in large cities.

© 2015 Elsevier Editora Ltda. All rights reserved.

Introdução

A função gonadal é gravemente afetada em pacientes do sexo masculino com LES. Recentemente, este grupo de estudo descreveu anormalidades graves no sêmen, com a presença de atrofia testicular, altos níveis de hormônio foliculoestimulante (FSH) e disfunção testicular das células de Sertoli associados com o tratamento com ciclofosfamida intravenosa (CICIV) em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico (LES).¹⁻³

A exposição a poluentes do ar também tem sido correlacionada com desfechos reprodutivos masculinos, especialmente com a qualidade do sêmen,⁴⁻⁹ embora esse fator ambiental não tenha sido estudado na população com LES do sexo masculino com o uso da avaliação da função gonadal.

Na verdade, a poluição do ar é composta por uma mistura heterogênea de gases e partículas que incluem ozônio (O₃), material particulado (PM₁₀), nitratos (NO), dióxido de enxofre (SO₂), subprodutos tóxicos da fumaça do cigarro e monóxido de carbono (CO) e pode provocar inflamação sistêmica e autoimunidade no LES.^{10,11}

Portanto, o objetivo deste estudo foi investigar prospectivamente a correlação entre a exposição a concentrações de poluentes atmosféricos e a qualidade do sêmen na Região Metropolitana de São Paulo em pacientes com LES.

Material e métodos

Foi feito um estudo longitudinal de painel com medidas repetidas com 35 pacientes pós-puberais do sexo masculino com LES, não fumantes, acompanhados regularmente pela Unidade de Reumatologia Pediátrica e Clínicas de Lúpus da Divisão de Reumatologia. Todos os pacientes preencheram os critérios de classificação para LES do American College of Rheumatology.¹² Nenhum tinha criptorquidia, hidrocele, hipospádia, infecção testicular (p. ex., caxumba), orquite, vasculite testicular, câncer testicular, disfunção ureteral e história prévia de qualquer cirurgia escrotal ou inguinal (p. ex., varicocele, vasectomia e correção de hérnia). Nove pacientes com LES foram excluídos, uma vez que não residiam na Região Metropolitana de São Paulo, apresentaram azoospermia ou tiveram apenas uma amostra de sêmen coletada. Portanto, entre janeiro de 2000 e janeiro de 2006, 26 pacientes com LES residentes na Região Metropolitana de São Paulo fizeram uma avaliação global da saúde reprodutiva, incluindo a coleta de duas amostras de sêmen de cada paciente, com um intervalo médio de um mês (variação de 0,7 a 8).

O Comitê de Ética do Hospital Universitário aprovou este estudo e foi obtido um termo de consentimento informado de todos os participantes.

Avaliação global da saúde reprodutiva

Dados demográficos e hábitos de estilo de vida: Foram registrados a idade atual, a duração da doença, os anos de escolaridade, o tabagismo e o consumo de álcool.

Avaliação urológica e ultrassonografia Doppler do testículo: Foi feito um exame clínico da genitália que incluiu a avaliação dos testículos, epidídimos, ductos deferentes, escroto e pênis. A avaliação era cega em relação à análise do sêmen. A avaliação clínica à procura de varicocele foi feita em uma sala aquecida (temperatura não inferior a 22 °C), com e sem manobra de Valsalva, e em duas posições (ortostática e decúbito dorsal).^{13,14} Mediram-se os volumes testiculares com o uso de um orquidômetro Prader. Um ultrassonografista especialista, cego em relação à análise do sêmen, fez uma ultrassonografia testicular de todos os pacientes com LES para avaliar a presença de varicocele radiográfica e os volumes testiculares. A maior medida em cada dimensão foi registrada e usada para calcular o volume testicular, de acordo com a fórmula para um elipsoide (comprimento x largura x espessura x 0,52). O valor médio normal em adolescentes pós-púberes e adultos do sexo masculino é de 15 ± 8 mL.¹⁵ Foi definido que o volume testicular era baixo se o paciente com LES apresentasse uma redução no volume testicular pela análise com o orquidômetro de Prader e/ou ultrassonografia. Foi determinada a presença de varicocele se o paciente com LES apresentasse uma hipertrofia no exame clínico ou radiográfico do plexo pampiniforme no escroto.¹³

Análise do sêmen e anticorpos antiespermatozoides: Foram feitas 52 análises do sêmen por dois tecnólogos médicos especialistas que desconheciam os outros parâmetros. Foram analisados o volume de sêmen, a concentração de espermatozoides, a contagem total de espermatozoides (total de espermatozoides por ejaculado) e a motilidade progressiva com base nas diretrizes da Organização Mundial da Saúde (OMS).¹⁶ Todos os pacientes cederam pelo menos duas amostras de sêmen (intervalo médio de um mês, variação de 0,7 a 8 meses) após 48 a 72 horas de abstinência sexual. Os espermatozoides foram analisados por contagem manual, bem como por um sistema de análise de sêmen assistido por computador sob aumento de 400X, com o uso de um HTM-2030. Cada lâmina foi digitalizada para estimar o número de espermatozoides por campo equivalente a 1 mL, para se obter uma concentração aproximada de espermatozoides em milhões de espermatozoides por mL de sêmen. A motilidade dos espermatozoides foi graduada como “a” (motilidade progressiva rápida), “b” (motilidade progressiva lenta), “c” (motilidade não progressiva) e “d” (sem motilidade).¹⁷ Determinou-se a presença de anticorpos antiespermatozoides em todos os pacientes pelo teste Immunobead direto com o uso de kits de imunoglobulina (IgA, IgG e IgM) anti-humana de coelho Immunobead^{DR} (Irvine Scientific, Santa Ana, CA, EUA).

Estado hormonal: Foram feitas determinações hormonais no início do estudo, cegas em relação aos outros parâmetros da função gonadal. Foram avaliados o FSH (valor normal: 1 a 10,5 UI/L) e a testosterona total matinal (271 a 965 ng/dL) por fluorimunoensaio com o uso de kits de ensaio de fluorimetria por tempo resolvido Delfia (Wallac, Turku, Finlândia). Os coeficientes de variação intra e interensaio foram limitados a 3,5% e 2,1%, respectivamente. Os níveis de inibina B [valor

normal: 74 a 470 pg/mL (12 a 17 anos de idade) e 60 a 300 pg/mL (18 a 50 anos de idade)] foram medidos em um amplificador enzimático em duplicata, de dois sítios, por imunoensaio tipo sanduíche (Diagnostic Systems Laboratories, Inc., Webster, Texas, EUA). Os coeficientes de variação intra e interensaio foram limitados a 3,5 a 5,6% e 6,2 a 7,6%, respectivamente. Foi considerada anormalidade hormonal gonadal se os níveis séricos de testosterona e/ou inibina B estivessem reduzidos ou os níveis séricos de FSH estivessem aumentados.

Avaliação e tratamento clínico

A atividade da doença e os danos cumulativos no momento da entrada no estudo foram medidos em todos os pacientes com o uso do SLE Disease Activity Index (Sledai)¹⁸ e o Systemic Lupus International Collaborating Clinics/ACR (SLICC/ACR) Damage Index.¹⁹ Foram determinados dados relacionados com o tratamento.

Qualidade do ar e dados meteorológicos

Foram obtidos dados diários sobre os poluentes estudados, incluindo o O₃ (a média horária mais alta), o SO₂ (a média em 24 horas), o NO₂ (a média horária mais alta), a PM₁₀ (a média em 24 horas) e o CO (a maior média móvel de oito horas), de todo o período de estudo. Os dados foram obtidos da Agência Ambiental do Estado de São Paulo (Cetesb) a partir de 13 estações automáticas espalhadas pela cidade. A concentração de PM₁₀ (radiação beta - FH621 N Graseby Andersen) foi medida em 12 dessas estações. Foi medida a maior média horária de O₃ (ultravioleta - Thermo EII - Modelo 49) e NO₂ (quimiluminescência - Thermo EII - Modelo 42) em quatro estações. A maior média móvel de oito horas foi medida em cinco estações para o CO (infravermelho não dispersivo - Thermo EII - Modelo 48) e em 13 estações para o SO₂ (fluorescência por pulso de luz ultravioleta - Thermo EII - Modelo 43).²⁰ Todos os poluentes foram medidos de 00:01 até 0 hora. A média de todas as estações que medem cada poluente foi adotada como um *status* de exposição em toda a cidade, uma vez que os níveis de poluentes do ar registrados em cada estação estiveram altamente correlacionados. A temperatura mínima diária e a média da umidade relativa do ar foram obtidas do Instituto de Astronomia e Geofísica da Universidade de São Paulo. A concentração de poluentes e as variáveis meteorológicas foram avaliadas diariamente por 90 dias antes da data da coleta de sêmen.

Análise estatística

Usou-se o método de equações de estimativas generalizadas (GEE), considerando os efeitos fixos para medidas repetidas para estimar a associação e o efeito dos poluentes sobre a concentração de espermatozoides, contagem de espermatozoides e motilidade progressiva. Foi empregado o software S-Plus 2000 Professional Release 3 (MathSoft Inc., Seattle, WA, EUA), ajustou-se o modelo para as variáveis independentes por meio de uma correlação de troca como uma matriz de trabalho, que pressupõe a igualdade de correlação das medidas em cada indivíduo. As variáveis dependentes foram definidas com base no percentil 5% dos limites de referência das diretrizes da OMS para a análise do sêmen: concentração de

espermatozoides (valor mínimo de 15 milhões por mL), contagem total de espermatozoides (valor mínimo de 39 milhões de espermatozoides por ejaculado) e motilidade progressiva (soma das porcentagens de espermatozoides com motilidade “a” e “b” – valor mínimo de 32%). As regressões foram ajustadas para variáveis independentes: idade atual, anos de escolaridade, tabagismo, consumo de álcool, tempo de abstinência sexual, volume testicular reduzido, presença de varicocele, anormalidade hormonal gonadal, presença de anticorpos antiespermatozoides, atividade da doença e danos cumulativos do LES, uso de prednisona, uso de imunossupressores (CICIV, azatioprina, micofenolato de mofetila e metotrexato), uso de outros medicamentos que alteram a qualidade do sêmen (inibidor da enzima conversora da angiotensina, espirolactona, cimetidina, haloperidol, carbamazepina e talidomida) e fatores relacionados com os poluentes do ar: temperatura, umidade relativa e concentração diária dos poluentes. Foi avaliada a estrutura de lag (intervalo de tempo) entre a exposição a poluentes do ar e as variáveis dependentes com o uso de lags de 0 a 90 dias e médias móveis de 2, 8 e 9 dias para os poluentes que eram estatisticamente significativos em modelos individuais. Por exemplo, uma média móvel de 2 dias é a média dos níveis de poluentes no dia concorrente e anterior atribuídos ao dia concorrente. As alterações foram analisadas principalmente no que diz respeito a períodos específicos do desenvolvimento de espermatozoides, os quais correspondem ao armazenamento epididimal, ao desenvolvimento de motilidade do espermatozoide e à duração total da espermatogênese (0-9, 10-14 e 70-90 dias antes da coleta, respectivamente).^{21,22} Foram usados modelos de poluentes únicos para a análise. No entanto, se mais de um poluente tivesse um efeito significativo sobre o desfecho, então eram adotados modelos de dois poluentes. Foram estimados os coeficientes de correlação de Pearson para as variáveis de poluentes atmosféricos. Foram notificados efeitos como uma diminuição nos desfechos [com o respectivo intervalo de confiança (IC) de 95%] para um aumento de um intervalo interquartil (IIQ) em cada poluente.

Resultados

Os dados demográficos, a atividade da doença, a avaliação hormonal, a avaliação urológica, a análise do sêmen e o tratamento de pacientes do sexo masculino com LES estão descritos na [tabela 1](#). Apenas seis pacientes receberam tratamento com corticosteroides e difosfato de cloroquina antes da puberdade. O intervalo de tempo médio entre a última dose de CICIV e a coleta de sêmen foi de $5,4 \pm 3,7$ anos.

A análise do sêmen dos pacientes com LES mostrou que a mediana da abstinência sexual e a média dos valores de volume de sêmen, pH, concentração de espermatozoides, contagem total de espermatozoides e motilidade progressiva dos espermatozoides estavam dentro dos parâmetros considerados como percentil 5% pelas diretrizes da OMS ([tabela 1](#)).

A umidade e a temperatura e o intervalo de variação das concentrações de poluentes e as condições meteorológicas durante o período avaliado são apresentados na [tabela 2](#). Nenhum dos poluentes ultrapassou os padrões nacionais brasileiros para os limites de qualidade do ar no período estudado.

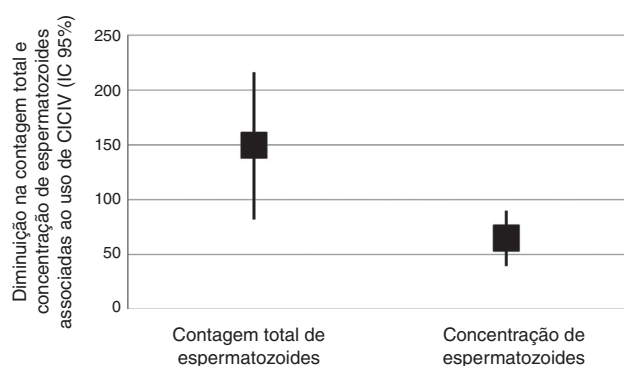


Figura 1 – Efeitos da ciclofosfamida intravenosa sobre a qualidade do sêmen.

Os poluentes atmosféricos primários estiveram altamente correlacionados, com coeficientes de Pearson que variaram de 0,48 (SO₂ e NO₂) a 0,77 (PM₁₀ e CO), com $p < 0,001$ e $p < 0,001$, respectivamente. O menor coeficiente de correlação de Pearson do ozônio foi com o CO (0,28), e o maior foi com o NO₂ (0,60), com $p = 0,04$ e $p < 0,001$, respectivamente. Uma vez que as medições do NO₂ eram feitas diariamente, nos dias com altas concentrações de NO₂ havia uma formação elevada de poluentes secundários, como o ozônio.

Nos modelos de regressão, somente o uso de CICIV e o ozônio estiveram associados à diminuição na qualidade do sêmen.

O uso da CICIV esteve associado à diminuição na concentração de espermatozoides (64,3 milhões/mL; IC 95%, 39,01-89,65; $p = 0,0001$), contagem total de espermatozoides (149,14 milhões por ejaculado; IC 95%, 81,93-216,38; $p = 0,017$) e motilidade progressiva dos espermatozoides (20,94%; IC 95%, 4,75-37,05; $p = 0,001$) nos períodos avaliados ([tabela 3](#)).

Em relação ao ozônio, um aumento de um intervalo interquartil (IIQ) (23,57 $\mu\text{g}/\text{m}^3$) na média desse poluente em um período de 0 a 90 dias esteve associado a um decréscimo de 30,6 milhões de espermatozoides/mL (IC 95%, 2,0 a 59,3; $p = 0,040$) no sêmen. A análise específica da exposição diária ao ozônio revelou que o período crítico era 80-88 dias antes da data de coleta da amostra, com uma diminuição acumulada de 22,9 milhões de espermatozoides/mL (IC 95%, 5,8-40,0; $p = 0,009$) e 70,5 milhões de espermatozoides/ejaculado (IC 95%, 12,3-128,7; $p = 0,016$) associada ao efeito cumulativo da exposição ao ozônio um IIQ maior (23,57 $\mu\text{g}/\text{m}^3$) ([fig. 1](#)). Não foram observados efeitos dos demais poluentes sobre a concentração ou contagem total de espermatozoides.

Não foram observados efeitos dos poluentes sobre a motilidade progressiva dos espermatozoides nas duas semanas após a exposição (período de desenvolvimento de motilidade), mas encontrou-se um efeito negativo em seis e sete semanas após a exposição ao ozônio (dos lags 31 a 38). O efeito cumulativo de oito dias de exposição a um aumento de um IIQ (23,57 $\mu\text{g}/\text{m}^3$) no ozônio esteve associado a uma redução de 5,7% (IC 95%, 0,6-10,7; $p = 0,023$) na motilidade progressiva dos espermatozoides.

Uma análise posterior dos 17 pacientes que nunca usaram CICIV mostrou que o efeito cumulativo de nove dias (80-88 dias) de exposição a um aumento de um IIQ no

Tabela 1 – Dados demográficos, atividade da doença, avaliação hormonal, avaliação urológica, análise do sêmen e tratamento de homens com lúpus eritematoso sistêmico (LES)

Características	Valores de referência	Valores dos pacientes (N = 26)	Sem uso CICIV (N = 17)	Uso CICIV (N = 9)	p
<i>Dados demográficos</i>					
Idade no início do estudo, anos		29,8 (8,9)	29,5 (2,1)	30,4 (3,2)	0,8
Idade de início do LES, anos; média (DP)		20,4 (9,6)	20,3 (10,4)	19,7 (8,5)	0,8
Idade na espermarca, anos; média (DP)		12,9 (1,0)	12,9 (1,2)	12,78 (0,6)	0,7
Duração da doença, anos; média (DP)		9,3 (6,5)	8,7 (6,9)	10,6 (5,8)	0,5
Escolaridade, anos; média (DP)		10,0 (3,3)	10,1 (2,9)	9,8 (3,0)	0,8
Tabagismo, n (%)		4 (15)	4 (28,6)	0 (0)	0,3
Consumo de álcool, n (%)		8 (31)	5 (29,4)	3 (33,3)	0,5
<i>Pontuação Sledai, n (%)</i>					
> 4		5 (19,2)	3 (17,6)	2 (22,2)	0,46
> 8		3 (11,5)	1 (5,9)	2 (22,2)	
<i>Avaliação hormonal</i>					
Hormônio foliculoestimulante, UI/L; média (DP)		7,6 (5,8)	6,3 (5,9)	10,0 (5,2)	0,16
Níveis elevados; n (%)		7 (26,7)	3 (17,6)	4 (44,4)	0,34
Inibina B, pg/mL; média (DP)		125,5 (78,0)	138,8 (73,6)	97,3 (84,5)	0,22
			3 (17,6)		
Níveis diminuídos; n (%)		7 (26,7)		4 (44,4)	0,34
Testosterona total, ng/dL; média (DP)		526,3 (243,3)	500,5 (264,8)	576,8 (201,2)	0,5
			2 (11,8)		
Níveis diminuídos; n (%)		2 (7,7)		0 (0)	0,5
<i>Uso de ciclofosfamida intravenosa (CICIV)</i>					
Uso atual; n (%)				9 (34,6)	
Uso prévio; n (%)				8,5 (12,01)	
Dose cumulativa (g); (média/DP)				9 (34,6)	
Número de pulsoterapias; n (%)				1,69 (1,47)	
Duração do tratamento; (média de anos/DP)					
<i>Outros fármacos que alteram a qualidade do sêmen n (%)</i>					
		10 (38,5)	5 (29,4)	5 (55,6)	0,2
<i>Avaliação urológica testicular</i>					
Redução do volume (clínico e US); n (%)		7 (26,9)	5 (29,4)	2 (22,2)	0,4
Varicocele clínica ou radiográfica; n (%)		11 (42,3)	7 (41,2)	4 (44,4)	1,0
<i>Análise do sêmen</i>					
	OMS 2010				
Abstinência sexual, dias; (mediana/IIQ)	> 2	3 (2,5)			
Volume de sêmen, mL; (média/DP)	> 1,5	2,3 (1,2)	2,1 (0,9)	2,9 (1,5)	0,1
pH do sêmen; (média/DP)	> 7,2	7,6 (0,3)	7,6 (0,3)	7,6 (0,3)	1,0
Concentração de espermatozoides, × 10 ⁶ /mL; (média/DP)	> 15	63,2 (72,0)	86,3 (77,8)	19,6 (28,7)	0,02
Contagem total de espermatozoides, × 10 ⁶ /mL; (média/DP)	> 39	147,3 (223,2)	209,9 (302,4)	46,1 (55,6)	0,1
Motilidade progressiva, %; (média/DP)	> 32	53,0 (23,0)	57,6 (17,7)	47,0 (26,4)	0,2
Anticorpos antiespermatozoides, %; (média/DP)	<20	29,0 (14,4)	29,3 (14,8)	28,8 (14,7)	0,9

Os resultados estão apresentados como n (%), média ± desvio padrão ou mediana (intervalo interquartil).

Tabela 2 – Estatísticas descritivas dos poluentes do ar, temperatura e umidade no período de estudo

	Mínimo	Máximo	Média	Desvio padrão	Quartis 25-75%
O ₃ (µg/m ³)	59,67	106,94	83,3	12,73	71,04-94,61
CO (ppm)	1,32	2,91	1,90	0,49	1,18-1,99
NO ₂ (µg/m ³)	84,4	159,44	64,45	16,60	77,28-85,13
SO ₂ (µg/m ³)	6,94	18,28	11,27	3,46	7,49-14,80
PM ₁₀ (µg/m ³)	30,33	55,87	38,36	7,30	31,71-45,41
Temperatura (°C)	11,4	18,6	15,6	2,18	13,28-17,39
Umidade (%)	53,79	98,02	77,04	8,92	79,2-82,11

O₃, ozônio; CO, monóxido de carbono; NO₂, dióxido de nitrogênio; SO₂, dióxido de enxofre; PM₁₀, material particulado.

Tabela 3 – Diminuição na contagem total e concentração de espermatozoides associados à exposição ao ozônio 80 a 90 dias antes da data da coleta da amostra de sêmen

	Redução (IC ^a 95%) O ₃ (IIQ ^b = 23,57 µg/m ³)			
	Contagem total de espermatozoides (Milhões por ejaculado)		Concentração de espermatozoides (Milhões por mL)	
	Diminuição	(IC 95%) ^a	Diminuição	(IC 95%) ^a
Lag 80	21,3	(4,8; 37,8) ^c	5,1	(0,2; 10,0) ^e
Lag 81	21	(7,8; 34,1) ^d	2,8	(-1,4; 7,1)
Lag 82	3	(-18,7; 24,8)	1,6	(-10,3; 7,1)
Lag 83	8,9	(-10,9; 28,8)	2	(-4,0; 7,9)
Lag 84	5,2	(-30,2; 19,8)	2,9	(-10,7; 4,9)
Lag 85	13,8	(-16,3; 43,9)	3,4	(-6,7; 13,6)
Lag 86	26,8	(4,3; 49,4) ^c	6,1	(-1,24; 13,4)
Lag 87	12,6	(-3,6; 28,7)	4,1	(-0,8; 9,0)
Lag 88	9,9	(-7,72; 27,5)	5,1	(0,2; 9,9)
Média móvel de 9 dias (80-88)	70,5	(12,3; 128,7) ^c	22,9	(5,8; 40,0) ^e

Lag n = n dias após a exposição.

^a Intervalo de confiança.

^b Intervalo interquartil.

^c p = 0,01.

^d p = 0,001.

^e p = 0,03.

ozônio esteve associado a uma diminuição de 30 milhões de espermatozoides/mL (IC 95%, 7,0-53,0; p = 0,011), 79 milhões de espermatozoides/ejaculado (IC 95%, 2,1-155,9; p = 0,044). O efeito cumulativo de oito dias (dias 31-38) esteve associado a uma diminuição de 6,6% (IC 95%, 2,9-10,3; p = 0,001) na motilidade progressiva dos espermatozoides.

Não foram encontradas associações significativas entre outros poluentes e outras variáveis dependentes em períodos específicos do desenvolvimento dos espermatozoides.

Discussão

Que se tem conhecimento, este foi o primeiro estudo a identificar os efeitos estruturais de lags (intervalo de tempo) de exposição à poluição troposférica sobre a qualidade do sêmen em pacientes com LES. O ozônio e a CICIV tiveram efeito prejudicial significativo sobre a espermatogênese.

O principal aspecto do presente estudo foi uma avaliação completa dos parâmetros gonadais em pacientes com lúpus pós-púberes e uma avaliação dos poluentes do ar na área metropolitana de uma cidade grande. Além disso, a metodologia de medidas repetidas deste estudo para a análise do sêmen teve a vantagem de exigir uma quantidade menor de indivíduos do que um estudo inteiramente casualizado, além de fornecer condições mais adequadas de covariáveis que poderiam influenciar a qualidade do sêmen sem a necessidade de avaliação de um grupo controle composto por indivíduos saudáveis.²³ Por outro lado, a análise de um subgrupo de pacientes não expostos à CICIV, um tratamento conhecido por ser gonadotóxico, possibilitou uma definição mais precisa do efeito prejudicial do ozônio sobre os espermatozoides. As principais limitações deste estudo foram o pequeno tamanho da amostra, particularmente daqueles pacientes com LES que foram previamente expostos à ciclofosfamida, e o fato de que as estações de monitoramento fixo não refletem

completamente a variação individual na exposição a poluentes. Além disso, a cidade de São Paulo tem uma população de 10.886.518 pessoas, com mais de seis milhões de veículos. Essa frota automotiva é a principal fonte de poluição do ar e observa-se que a concentração de ozônio tem aumentado progressivamente.²⁰ Os níveis de poluentes no ar registrados nas estações de São Paulo se correlacionaram amplamente entre si e até mesmo o ozônio apresentou correlações positivas estatisticamente significativas com os poluentes primários analisados neste estudo. A ausência de efeito dos outros poluentes sobre a qualidade do sêmen pode ser decorrente da alta correlação entre os poluentes do ar encontrada por este estudo. Na verdade, cada poluente analisado pode ser considerado um bom marcador independente para uma complexa mistura de poluição do ar. Desse modo, é possível supor que os efeitos sobre a qualidade do sêmen foram decorrentes da ação de todos os critérios de poluentes de ar.

A poluição do ar é composta por uma mistura heterogênea de gases e partículas, incluindo o O₃. O estresse oxidativo e a inflamação induzidos por esse poluente podem resultar em distúrbios respiratórios,²⁴⁻²⁶ bem como contribuir para um estado de inflamação sistêmica^{27,28} e autoimunidade.¹⁰

Além disso, o ozônio pode induzir a um estresse oxidativo testicular e produção excessiva de radicais livres, que podem provocar danos aos espermatozoides maduros e apoptose de células germinativas e resultar em redução na concentração e motilidade dos espermatozoides,²⁹ como observado neste estudo. Em relação a isso, Sokol et al. (2006)⁸ observaram uma associação entre a qualidade do sêmen e a exposição ao ozônio. Hansen et al. (2010)⁹ relataram a mesma associação com o aumento na PM_{2,5}. A poluição do ar também pode influenciar a fertilidade masculina⁷⁻⁹ em decorrência de perturbações endócrinas, danos ao DNA do sêmen e toxicidade mediada pelo receptor de hidrocarboneto aromático.^{30,31}

Curiosamente, a exposição aos poluentes do ar pode afetar o desenvolvimento das células germinativas, incluindo

todo o período (90 dias) ou períodos específicos do desenvolvimento do espermatozoide antes da coleta da amostra (armazenamento epididimal ou desenvolvimento de motilidade dos espermatozoides).^{4,8,9} Hammoud et al. (2010)⁴ descobriram que a poluição do ar leva a uma diminuição na motilidade progressiva depois de mais de quatro semanas de exposição. Na verdade, a motilidade espermática é um evento tardio na espermatogênese; durante o trânsito epididimal, os espermatozoides sofrem alterações na morfologia, química e motilidade. Nosso estudo sugere que a exposição a poluentes poderia ser prejudicial à motilidade progressiva em pacientes com LES, antes mesmo de o espermatozoide alcançar o epidídimo (0 a 14 dias antes de coletar o sêmen).

Além disso, foi confirmada e estendida por meio de um complexo modelo estatístico que a CICIV era uma causa importante de prejuízo à espermatogênese,^{1-3,13,14,32-37} o que enfatiza a relevância da criopreservação de sêmen de homens pós-púberes a fim de garantir a possibilidade de reprodução após esta terapia imunossupressora.^{38,39}

Em conclusão, o ozônio e o uso de CICIV tiveram um efeito adverso consistente sobre a qualidade do sêmen de pacientes com LES. Foi identificado ainda que essa anormalidade não é restrita ao início da espermatogênese, ocorre também em fases posteriores. Por conseguinte, deve-se considerar a minimização da exposição à poluição do ar, especialmente para pacientes que residem em grandes cidades.

Conflitos de interesse

Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

Financiamento

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), 305068/2014-8 para EB e 302.724/2011-7 para CAS, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Fapesp), 2004/07832-2 para CAS, 2005/56482-7 para CAS e 2008/58238-4 para CAS, Federico Foundation (para CAS e EB) e Núcleo de Apoio à Pesquisa Saúde da Criança e do Adolescente da USP (NAP-CriAd) para CAS.

REFERÊNCIAS

- Soares PM, Borba EF, Bonfa E, Hallak J, Correa AL, Silva CA. Gonad evaluation in male systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 2007;56:2352-61.
- Suehiro RM, Borba EF, Bonfa E, Okay TS, Cocuzza M, Soares PM, et al. Testicular Sertoli cell function in male systemic lupus erythematosus. *Rheumatology.* 2008;47:1692-7.
- Vecchi AP, Borba EF, Bonfa E, Cocuzza M, Pieri P, Kim CA, et al. Penile anthropometry in systemic lupus erythematosus patients. *Lupus.* 2011;20:512-8.
- Hammoud A, Carrell DT, Gibson M, Sanderson M, Parker-Jones K, Peterson CM. Decreased sperm motility is associated with air pollution in Salt Lake City. *Fertil Steril.* 2010;93:1875-9.
- Selevan SG, Borkovec L, Slott VL, Zudová Z, Rubes J, Evenson DP, et al. Semen quality and reproductive health of young Czech men exposed to seasonal air pollution. *Environ Health Perspect.* 2000;108:887-94.
- Guven A, Kayikci A, Cam K, Arbak P, Balbay O, Cam M. Alterations in semen parameters of toll collectors working at motorways: does diesel exposure induce detrimental effects on semen? *Andrologia.* 2008;40:346-51.
- Rubes J, Selevan SG, Evenson DP, Zudova D, Vozdova M, Zudova Z, et al. Episodic air pollution is associated with increased DNA fragmentation in human sperm without other changes in semen quality. *Hum Reprod.* 2005;20:2776-83.
- Sokol RZ, Kraft P, Fowler IM, Mamet R, Kim E, Berhane KT. Exposure to environmental ozone alters semen quality. *Environ Health Perspect.* 2006;114:360-5.
- Hansen C, Luben TJ, Sacks JD, Olshan A, Jeffay S, Strader L, et al. The effect of ambient air pollution on sperm quality. *Environ Health Perspect.* 2010;118:203-9.
- Farhat SC, Silva CA, Orione MA, Campos LM, Sallum AM, Braga AL. Air pollution in autoimmune rheumatic diseases: a review. *Autoimmun Rev.* 2011;11:14-21.
- Vidotto JP, Pereira LA, Braga AL, Silva CA, Sallum AM, Campos LM, et al. Atmospheric pollution: influence on hospital admissions in paediatric rheumatic diseases. *Lupus.* 2012;21:526-33.
- Hochberg MC. Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 1997;40:1725.
- Nukumizu LA, Gonçalves Saad C, Ostensen M, Almeida BP, Cocuzza M, Gonçalves C, et al. Gonadal function in male patients with ankylosing spondylitis. *Scand J Rheumatol.* 2012;41:476-81.
- Almeida BP, Saad CG, Souza FH, Moraes JC, Nukumizu LA, Viana VS, et al. Testicular Sertoli cell function in ankylosing spondylitis. *Clin Rheumatol.* 2013;32:1075-9.
- Colli AS, Berquio ES, Marques RM. Crescimento e desenvolvimento pubertário em crianças e adolescentes brasileiros. In: Colli AS, Berquio ES, Marques RM, editors. *Volume testicular.* 1 ed. São Paulo: Brasileira de Ciências Ltda; 1984. p. 1-34.
- Cooper TG, Noonan E, von Eckardstein S, Auger J, Baker HW, Behre HM, et al. World Health Organization reference values for human semen characteristics. *Hum Reprod Update.* 2010;16:231-45.
- Rowe PJ, Comhaire FH, Hargreave TB, Mahmoud AM. World Health Organization (WHO) for the standardized investigation, diagnosis and management of the infertile men. Cambridge: Cambridge University Press; 2000.
- Bombardier C, Gladman D, Urowitz MB, Karon D, Chang CH. The Committee on Prognosis Studies in SLE. Derivation of the SLEDAI: a disease activity index for lupus patients. *Arthritis Rheum.* 1992;35:630-40.
- Gladman D, Ginzler E, Goldsmith C, Fortin P, Liang M, Urowitz M, et al. The development and initial validation of the systemic lupus international collaborating clinics/American College of Rheumatology damage index for systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 1996;39:363-9.
- CETESB. Disponível em: http://www.cetesb.sp.gov.br/Ar/ar_automatica.asp. [acessado em 10.06.13].
- Johnson L, Welsch TH Jr, Wilker CE. Anatomy and physiology of the male reproductive system and potential targets of toxicants. In: Sipes IG, McQueen CA, Gandolfi AJ, editors. *Comprehensive Toxicology.* New York: Pergamon; 1997. p. 5-98.
- Robaire B, Hermo L. Efferent ducts, epididymis and vas deferens. In: Knobil E, Niell J, editors. *Physiology of Reproduction.* 3 ed. New York: Raven Press; 1994. p. 999-1000.
- Andrefß HJ, Golsch K, Schmidt AW. *Applied Panel Data Analysis for Economic and Social Surveys.* 1 ed. Berlin: Springer-Verlag; 2013.

24. Kosmider B, Loader JE, Murphy RC, Mason RJ. Apoptosis induced by ozone and oxysterols in human alveolar epithelial cells. *Free Radic Biol Med.* 2010;48:1513-24.
25. Fraga J, Botelho A, Sá A, Costa M, Quaresma M. The lag structure and the general effect of ozone exposure on pediatric respiratory morbidity. *Int J Environ Res Public Health.* 2011;8:4013-24.
26. Farhat SC, Almeida MB, Silva-Filho LV, Farhat J, Rodrigues JC, Braga AL. Ozone is associated with an increased risk of respiratory exacerbations in cystic fibrosis patients. *Chest.* 2013;144:1186-92.
27. Gryparis A, Forsberg B, Katsouyanni K, Analitis A, Touloumi G, Schwartz J, et al. Acute effects of ozone on mortality from the air pollution and health: a European approach project. *Am J Respir Crit Care Med.* 2004;15(170):1080-7.
28. Watkinson WP, Campen MJ, Nolan JP, Costa DL. Cardiovascular and systemic responses to inhaled pollutants in rodents: effects of ozone and particulate matter. *Environ Health Perspect.* 2001;109:539-46.
29. Agarwal A, Saleh RA, Bedaiwy MA. Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. *Fertil Steril.* 2003;79:829-43.
30. Knuckles TL, Dreher KL. Fine oil combustion particle bioavailable constituents induce molecular profiles of oxidative stress, altered function, and cellular injury in cardiomyocytes. *J Toxicol Environ Health.* 2007;70:1824-37.
31. Veras MM, Caldini EG, Dolhnikoff M, Saldiva PH. Air pollution and effects on reproductive-system functions globally with particular emphasis on the Brazilian population. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev.* 2010;13:1-15.
32. Silva CA, Hallak J, Pasqualotto FF, Barba MF, Saito MI, Kiss MH. Gonadal function in male adolescents and young males with juvenile onset systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol.* 2002;29:2000-5.
33. Moraes AJ, Pereira RM, Cocuzza M, Casemiro R, Saito O, Silva CA. Minor sperm abnormalities in young male post-pubertal patients with juvenile dermatomyositis. *Braz J Med Biol Res.* 2008;41:1142-7.
34. Ostensen M, Brucato A, Carp H, Chambers C, Dolhain RJ, Doria A, et al. Pregnancy and reproduction in autoimmune rheumatic diseases. *Rheumatology (Oxford).* 2011;50:657-64.
35. Silva CA, Cocuzza M, Borba EF, Bonfá E. Cutting-edge issues in autoimmune orchitis. *Clin Rev Allergy Immunol.* 2012;42:256-63.
36. Rabelo-Júnior CN, Freire de Carvalho J, Lopes Gallinaro A, Bonfá E, Cocuzza M, Saito O, et al. Primary antiphospholipid syndrome: morphofunctional penile abnormalities with normal sperm analysis. *Lupus.* 2012;21:251-6.
37. Rabelo-Júnior CN, Bonfá E, Carvalho JF, Bonfá E, Cocuzza M, Saito O, et al. Penile alterations with severe sperm abnormalities in antiphospholipid syndrome associated with systemic lupus erythematosus. *Clin Rheumatol.* 2013;32:109-13.
38. Silva CA, Brunner HI. Gonadal functioning and preservation of reproductive fitness with juvenile systemic lupus erythematosus. *Lupus.* 2007;16:593-9.
39. Silva CA, Bonfa E, Østensen M. Maintenance of fertility in patients with rheumatic diseases needing antiinflammatory and immunosuppressive drugs. *Arthritis Care Res (Hoboken).* 2010;62:1682-90.