

GILMAR PEREIRA SILVA

**EFEITO DA INFLAMAÇÃO SISTÊMICA NA QUALIDADE DO SÊMEN
DE PACIENTES RENAIIS CRÔNICOS SUBMETIDOS À HEMODIÁLISE:
ANÁLISE DOS NÍVEIS DE FERRITINA E TRANSFERRINA SEMINAL**

BRASÍLIA – DF, 2018

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

GILMAR PEREIRA SILVA

**EFEITO DA INFLAMAÇÃO SISTÊMICA NA QUALIDADE DO SÊMEN
DE PACIENTES RENAIIS CRÔNICOS SUBMETIDOS À HEMODIÁLISE:
ANÁLISE DOS NÍVEIS DE FERRITINA E TRANSFERRINA SEMINAL**

Tese apresentada como requisito parcial para obtenção do Título de Doutor em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

Orientadora: Profa. Dra. Fabiana Pirani Carneiro

BRASÍLIA
2018

GILMAR PEREIRA SILVA

**Efeito da Inflamação Sistêmica na Qualidade
do Sêmen de Pacientes Renais Crônicos
Submetidos à Hemodiálise: Análise dos Níveis
de Ferritina e Transferrina Seminal**

Tese apresentada como requisito parcial para obtenção do
Título Doutor em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós-
Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de
Brasília.

Aprovada em ---/---/-----

BANCA EXAMINADORA

1º Membro (Presidente) - Profa. Dra. Fabiana Pirani Carneiro
Universidade de Brasília – FM-UnB

2º Membro (Interno) – Prof. Dr. Diego Madureira Oliveira
Universidade de Brasília – FS-UnB

3º Membro (Externo) – Profa. Dra. Rosângela Vieira de Andrade
Universidade Católica de Brasília – UCB

4º Membro (Interno) – Profa..Dra. Andréa Barretto Motoyama
Universidade de Brasília – FM-UnB

5º Membro (Suplente) – Prof. Dr. Joel Paulo Russomano Viegas
Universidade de Brasília – FM-UnB

*Dedico a presente Tese, com a benção do criador, à
minha família por sempre me apoiar nesta longa
caminhada até conquistar esta representativa
conquista acadêmica e por ter se privado de minha
companhia durante o tempo dedicado aos estudos,
representadas nas pessoas de:*

*Minha avó, Manuelita Alves Pereira, “in memoriam”,
Minha mãe, Marieta Pereira da Silva,
Minha esposa, Iraine Peixoto Xavier Pereira,
Meus filhos Vítor Pereira Xavier Granjeiro e
Maria Clara Pereira Xavier Granjeiro e
aos Amigos que direta ou indiretamente contribuíram
para alcançar este distinto grau Acadêmico.*

A G R A D E C I M E N T O S

À minha orientadora, Prof.^a Doutora **FABIANA PIRANI CARNEIRO**, Professora da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília, por acreditar na minha potencialidade de aluno de Doutorado, por sua dedicação e ensinamentos adquiridos durante sua orientação;

Ao Dr. **Joel Paulo Russomano Vieg**a Chefe do Setor de Hemodiálises da Hospital Universitário (HuB) da Universidade de Brasília por seu incentivo, coleguismo, entusiasmo e na fase inicial na realização desta pesquisa; e

A todos os funcionários do Laboratório de Análise Clínica do HuB pela gentileza, presteza e zelo no processamento do material biológico deste estudo.

*À cidade de Caxias**

*Quanto és bela, ó Caxias! — no deserto,
Entre montanhas, derramada em vale
De flores perenais,
És qual tênue vapor que a brisa espalha
No frescor da manhã meiga soprando
À flor de manso lago.*

*Canção do Tamoio**

*Não chores, meu filho;
Não chores, que a vida
É luta renhida:
Viver é lutar.
A vida é combate,
Que os fracos abate,
Que os fortes, os bravos
Só pode exaltar.*

(*Antônio Gonçalves Dias, 1823-1864)

RESUMO

Introdução: a disfunção gonadal instala-se no curso de muitas doenças agudas ou crônicas como resultado da ação de toxinas endógenas ou exógenas, processos inflamatórios e oxidativo agudos ou crônicos. A disfunção gonadal promove alterações nos níveis de hormônios sexuais e na qualidade seminal, manifestando-se clinicamente por alterações de fertilidade (sub/infertilidade). Mesmo não se encontrado estudos que avaliem o percentual de portadores de doença renal crônica hemodialítica no sexo masculino com alterações na qualidade seminal, admite-se que não seja desprezível o percentual daqueles com alterações importantes de qualidade seminal manifestada por oligospermia, teratospermia e azoospermia. Os estudos até então existentes atribuem estas alterações neste grupo de doentes predominantemente a fatores urêmicos e oxidativo comumente associados aos mesmos. Considerando que cerca de 40-60% dos doentes renais crônicos em hemodiálise apresentam processo inflamatório sistêmico crônico, resolveu-se verificar se inflamação sistêmica interfere nos níveis de ferritina seminal (Fts) e transferrina seminal (Tfs) e se estas estão associadas aos parâmetros seminais(PS) e índice de fertilidade(IF), considerando a possível propriedade antioxidativa atribuída a estas proteínas. **Metodologia:** estudo transversal realizado no Setor de Hemodiálise do Hospital Universitário da Universidade de Brasília entre julho de 2016 e dezembro de 2016 em homens com idade entre 18 e 60 anos, sem hepatopatia aguda ou crônica e eugonádicos. Aqueles com diagnóstico de hemocromatose ou doenças do metabolismo do ferro foram excluídos. Amostra composta de 60 casos de doença renal hemodialítica crônica subdividida em três subgrupos de acordo com o nível sérico de proteína C-reativa (PCR) ultra-sensível: grupo 1 ("com inflamação" n = 30, CRP > 5 ng / ml), grupo 2 (sem inflamação, n = 30, PCR ≤ 5ng / ml), grupo 3 (grupo 1 + grupo 2) e grupo 4 (controle saudáveis, n = 30, PCR ≤ 1 ng / ml). Foram utilizadas amostras de sangue e colheita de esperma para analisar os parâmetros bioquímicos e hematológicos (ureia, creatinina, frações de albumina, globulina e hemograma completo), parâmetros hormonais (hormônio folículo estimulante (FSH), hormônio luteinizante (HL), testosterona total (TT), prolactina (PRL), Fts e Tfs, PCR sérica, parâmetro seminal (espermograma - método manual), cálculo de IF e preparação de fluido seminal por centrifugação. **Resultados:** parâmetros hematológicos e bioquímicos (hemoglobina, ureia, creatinina e albumina); PS; parâmetros hormonais (FSH, LH, TT e PRL); IF e Tfs foram significativamente menores no grupo 3 que no grupo 4. Não houve diferenças significativas para variáveis idade, globulina e Fts. O fator inflamatório analisado

isoladamente parece não interferir nos subgrupos casos (grupos 1 e 2), mas houve diferenças significativas ($P < 0,05$) encontrados entre grupos 3 e 4 para as variáveis (parâmetros bioquímicos, seminal, hormonal, IF e Tfs). A Fts não se correlacionou ($p > 0,05$) com IF, PS, FSH, TT e Tfs, independentemente do *status* inflamatório. A Tfs correlacionou-se positivamente ($p \leq 0,001$), independente do *status* inflamatório, com IF e parâmetros seminais, exceto a morfologia espermática no grupo sem inflamação ($r = 0,272$; $p = 0,146$) e hormônios. A PCR correlacionou-se com Fts e motilidade espermática no grupo sem inflamação. **Conclusões:** sendo a inflamação sistêmica crônica prevalente nos pacientes renais crônicos, o presente estudo tem sua importância por ser o primeiro a verificar o possível efeito do fator inflamatório, definido pelos níveis de PCR sérica, sobre a qualidade seminal, considerando que estudos prévios atribuem estas alterações predominantemente a fatores uréticos, oxidativos e hormonais. Os resultados aqui obtidos sugerem que a inflamação sistêmica parece não interferir significativamente nos níveis de ferritina/transferrina seminal. Mas a transferrina seminal parece útil na avaliação inicial destes pacientes com suspeita de infertilidade por alteração na qualidade seminal por se mostrar associada a todos os parâmetros seminais e índice de fertilidade.

Palavras-chave: Doença renal crônica; hemodiálises; infertilidade masculina; inflamação sistêmica; estresse oxidativo; ferritina seminal e transferrina seminal.

ABSTRACT

Introduction: gonadal dysfunction occurs in the course of many acute or chronic diseases as a result of the action of endogenous or exogenous toxins, acute or chronic inflammatory and oxidative processes. The gonadal dysfunction promotes changes in sex hormone levels and seminal quality, manifested clinically by changes in fertility (sub / infertility). Even if we did not find studies that evaluate the percentage of patients with chronic hemodialytic kidney disease in males with changes in seminal quality, it is admitted that the percentage of such as important seminal quality changes manifested by oligospermia, teratospermia and azoospermia is not negligible. Previous studies have attributed these changes in this group of patients, predominantly to uremic and oxidative factors commonly associated with them. Considering that about 40-60% of chronic renal patients undergoing hemodialysis present a chronic systemic inflammatory process, it was decided to verify if systemic inflammation interferes in the levels of seminal ferritin (Fts) and seminal transferrin (Tfs) and whether these are associated with seminal parameters and fertility index (IF), considering the possible antioxidative property attributed to these proteins. **Methodology:** a cross-sectional study carried out in the Hemodialysis Sector of the University Hospital of the University of Brasília between July 2016 and December 2016 in men aged between 18 and 60 years, without acute or chronic hepatopathy and eugonadic. They were excluded those with a diagnosis of hemochromatosis or diseases of iron metabolism. Sample composed of 60 cases of patients on chronic hemodialysis subdivided into three subgroups according ultrasensitive c-reactive protein (CRP) serum level: group 1 ("with inflammation", n = 30, CRP > 5 ng / ml), group 2 (without inflammation, n = 30, PCR ≤ 5ng / ml), group 3 (group 1 + group 2) and group 4 (healthy controls, n = 30, PCR ≤ 1ng / ml). Blood samples and sperm harvested to indicate biochemical and hematological parameters (urea, creatinine, albumin and globulin fractions and complete blood count), hormonal parameters (follicle stimulating hormone(FSH), luteinizing hormone(LH), total testosterone(TT), prolactin(PRL), SF and ST, serum CRP and SP(spermogram - manual method), calculation of fertility index(FI) and preparation of seminal fluid by centrifugation. **Results:** hematological and biochemical parameters (hemoglobin, urea, creatinine and albumin); SP; hormonal parameters (FSH, LH, TT and PRL); FI and ST were significantly lower in the group 3 compared to the group 4. There were no significant differences for age, globulin and SF variables (P <0.05). The inflammatory factor analyzed alone does not seem to interfere in the

subgroups cases (groups 1 and 2), but there were significant differences ($P < 0.05$) found between groups 3 and 4 for the variables (biochemical, seminal and hormonal parameter, FI and ST. SF did not correlate ($p > 0.05$) with FI, SP, FSH, TT and ST, independently of the inflammatory status. ST was positively correlated ($p \leq 0.001$), independently of inflammatory status, with FI and seminal parameters, except the sperm morphology of the without inflammation group ($r = 0.272$, $p = 0.146$) and hormones. CRP correlated with SF and sperm motility in the without inflammation group. **Conclusions:** since chronic systemic inflammation is prevalent in chronic renal patients, the present study is important because it is the first to verify the possible effect of the inflammatory factor defined by serum CRP levels on seminal quality, whereas that previous studies have attributed these changes predominantly to the uremic and oxidative factors commonly associated with these patients. The results obtained here suggest that systemic inflammation does not appear to significantly interfere with seminal ferritin / transferrin levels. But seminal transferrin seems useful in the initial evaluation of these patients with suspected infertility by alteration in seminal quality because it is associated with all seminal parameters and fertility index.

Key-words: Chronic renal disease; hemodialysis; male infertility; systemic inflammation; oxidative stress; seminal ferritin and seminal transferrin.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Anatomofisiologia dos túbulos seminíferos.....	19
Figura 2 Modelo de suprimento de íons ferro às células germinativas.....	23
Figura 3 Sistema antioxidativo enzimático e metaloproteínas.....	26
Figura 4 Exames laboratoriais realizados na pesquisa.....	30

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Parâmetros seminais avaliados no espermograma.....	31
Tabela 2	Análise comparativa dos parâmetros avaliados.....	35
....		
Tabela 3	Análise comparativa dos parâmetros avaliados segundo fator inflamatório.....	36
Tabela 4	Avaliação correlacional entre níveis seminais de ferritina/transferrina, índice fertilidade, parâmetros seminais e hormonais em grupos de caso....	37
Tabela 5	Avaliação correlacional entre nível sérico de PCR e níveis seminais de ferritina e transferrina, índice fertilidade, parâmetros seminais e hormonais em grupo de caso.....	38
Tabela 6	Parâmetros seminais e índice de fertilidade de hemodialíticos crônicos versus pacientes saudáveis evidenciados em estudo atual e anteriores.....	42
Tabela 7	Parâmetros hormonais de hemodialíticos crônicos versus pacientes saudáveis evidenciados em estudo atual e anteriores.....	55

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ânion Superóxido(O_2^-)

Barreira Hematotesticular(BHT)

Catalase (CAT)

Células de Leydig (CL)

Células de Sertoli (CS)

Células Germinativas(CG)

Dehidroepiandrosterona (DHEA)

Desvio Padrão (DS)

Disfunção Gonadal (DG)

Doença Renal Crônica (DRC)

Eixo Hipotálamo-Hipófise-Gonadal (EHHG)

Elementos Sensíveis a Íons (ESIs)

Espécies Reativas ao Oxigênio(ERO)

Estresse Oxidativo(EO)

Fator de Necrose Tumoral Alfa($TNF\alpha$)

Fator Nuclear kB (FN-kB)

Ferritina Seminal(Fts)

Ferritina(Ft)

FSH (Hormônio Folículo Estimulante)

Globulina Transportadora de Hormônio Sexual (GTHS)

Glutaciona Peroxidase(GSH)

Hemodiálise Crônica(HC),

Hormônio do Crescimento (GH)

Hormônio Liberador de Gonadotrofina(GnRH)

IL (interleucina)

Inflamação Sistêmica (IS)

Inflamação Sistêmica Crônica(ISC)
Interferon Gama (IFN γ)
LH(Hormônio Luteinizante)
Lipopolisacarídeos (LPS)
Má nutrição-Inflamação-aterosclerose (MIA)
Média (M)
Organização Mundial de Saúde (OMS)
Parâmetro Hormonal (PH)
Parâmetro Seminal (PS)
PCR(Proteína C Reativa)
Peróxido de Hidrogênio (H₂O₂)
Prolactina(PRL)
Proteínas Reguladoras de Íons (PRIs)
Radicais Livres(RLs)
Radical Hidroxila (OH⁻) Receptor
de Transferrina(RTf1) Renal
Crônico Hemodialítico (RCH)
Superóxido Desmutase (SDO),
Taxa de Filtração Glomerular (GFR)
Transferrina Seminal(Tfs)

SUMÁRIO

RESUMO	6
ABSTRACT	8
LISTA DE FIGURAS	10
LISTA DE TABELAS	11
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	12
1 INTRODUÇÃO	16
1.1 Disfunção gonadal na doença sistêmica.....	16
1.2 Disfunção gonadal na doença renal crônica.....	17
1.2.1 Fatores urêmico e hormonal.....	17
1.2.2 Fatores oxidativo e inflamatório.....	17
1.3 Anatomofisiologia testicular.....	19
1.3.1 Histologia testicular.....	19
1.3.2 Funções “nurses” das células de Sertoli.....	20
1.3.3 Regulação neuro-imuno-endócrina testicular: papel das citocinas.....	21
1.3.4 Sistema de suprimento de íon às células germinativas.....	22
1.4 Evidências de secreção de ferritina e transferrina pela gônada masculina.....	23
1.5 Sistema antioxidativo.....	24
1.5.1 Sistema antioxidativo enzimático.....	25
1.5.2 Sistema antioxidativo não enzimático.....	26
1.6 Hipótese.....	27
1.7 Justificativa.....	27
2 OBJETIVOS	28
2.1 Geral.....	28
4.2 Específico.....	28
3 MATERIAL E MÉTODO	29
3.1 Recrutamento, amostra, inclusão e exclusão.....	29
3.2 Delineamento experimental.....	30
3.3 Índice de fertilidade.....	31
3.4 Análise estatística.....	32
4 RESULTADOS	33

5 DISCUSSÃO	40
5.1 Análise da anemia, hipoalbuminemia e fator idade.....	39
5.2 Ferritina seminal versus parâmetro seminal e índice de fertilidade.....	44
5.3 Transferrina seminal versus parâmetro seminal e índice de fertilidade.....	48
5.4 Inflamação sistêmica versus parâmetro seminal, índice de fertilidade, ferritina e transferrina seminal.....	50
5.5 Parâmetros hormonais versus parâmetro seminal, ferritina e transferrina seminais.....	54
6. CONCLUSÕES	58
REFERÊNCIAS	59
ANEXOS	66
APÊNDICES	74

1.1 INTRODUÇÃO

1.1 DISFUNÇÃO GONADAL NA DOENÇA SISTÊMICA

As gônadas são afetadas significativamente por doenças agudas ou crônicas(1). Pode culminar com alterações morfofuncionais em graus variados manifestados clinicamente por alterações no *status* androgênico, disfunção sexual e infertilidade(1). Este conjunto de alterações denominamos de disfunção gonadal(DG)(1). O *status* androgênico pode se manifestar como hipogonadismo clínico ou subclínico(1).

Disfunção sexual se manifesta principalmente por alterações de libido (em ambos os sexos), disfunção erétil no homem e Infertilidade manifestada por alterações na espermatogênese (homens) e ovulação (mulheres)(2). As causas são variadas e as enfermidades clínicas que mais comumente promovem DG são disfunções hepáticas, renais, pulmonares, gastrointestinais, neurológicas, endocrinológicas, imunológicas, infecciosas, cardiovasculares, hematológicas e neoplasias(1).

Quaisquer dos fatores citados acima promovem DG por alteração isolada ou associadas, direta ou indireta em um dos sítios do eixo hipotálamo-hipófise-gonadal (EHHG) com reflexo direto nos níveis de hormônios séricos e ou alterações morfofuncionais glandulares(3).

A DG pode ser aguda ou crônica. A primeira é predominantemente devida a supressão de liberação de gonadotrofinas hipotalâmicas Hormônio Folículo Estimulante(FSH) e Hormônio Luteinizante(LH) e secundariamente à falência gonadal primária; DG crônica, os mecanismos se invertem(4).

A avaliação da DG é realizada por exame clínico e laboratorial específicos que mensuram gonadotrofinas hipofisárias e hormônios sexuais, associados ou não a teste estimulatório/supressor de avaliação de integridade do EHPG(4).

1.2 DISFUNÇÃO GONADAL NA DOENÇA RENAL CRÔNICA

A doença renal crônica (DRC) está associada à diminuição da espermatogênese e esteriodogênese testicular e frequentemente leva à DG manifestada por infertilidade (4). A DG neste grupo de paciente é multifatorial, envolvendo fatores urêmico, hormonal, inflamatórios e oxidativos(5).

1.2.1 Fatores Urêmico e Hormonal

O efeito na uremia se inicia com a redução de taxa de filtração glomerular e piora com evolução progressiva da doença(6). A uremia altera a produção de espermatozoides (espermatogênese) por seu possível efeito inibitório sobre as células germinativas, alteração na síntese de testosterona (esteriodogênese) e função sexual por interferência em um ou mais sítios do (EHHG)(6). São admitidos os seguintes efeitos da uremia sobre o (EHHG)(6): redução dos níveis de testosterona sérica e ou intratesticular por bloquear receptores de LH e aumentar a resistência das células de Leydig(CL) aos estímulos LH ; alterar a liberação pulsátil de LH hipofisário; bloqueia a produção de inibina testicular pelas células de Sertoli(SC) responsável pelo bloqueio hipofisário de FSH; alterar a liberação das gonadotrofinas hipofisárias e por fim elevam LH, FSH e gonadotrofinas pela redução do *clerance* renal. Laboratorialmente, o padrão hormonal na uremia é caracterizado por elevação plasmática de LH, FSH e redução dos níveis de testosterona em escala variável, podendo chegar ao hipogonadismo em até 50% dos portadores de DRC(6).

1.2.2 Fatores Oxidativo e Inflamatório

É admitido que a DRC seja um estágio de doença inflamatória crônica(7). As causas da inflamação sistêmica crônica(ISC) nos pacientes hemodialíticos não são

bem conhecidas, sendo comumente atribuídos fatores associados à *uremia* (redução do clearance das citocinas, insuficiência cardíaca, aterosclerose, estresse oxidativo(EO), disfunção endotelial), aos inerentes à *hemodiálise* (infecção de acesso, bioincompatibilidade de membrana dialítica, exposição à endotoxinas), aos *fatores genéticos* (polimorfismo genético populacional responsável pela expressão gênica de citocinas pró e anti – inflamatórias e proteína c reativa(PCR), todos concorrendo para estabelecimento um estado permanente de hipercitokinemia no paciente urêmico(8).

Admite-se atualmente conexão entre inflamação sistêmica(IS) e EO na fisiopatologia de iniciação e progressão de algumas entidades clínicas como diabetes tipo 2, doenças cardiovasculares e DRC(9). A DRC, especialmente naqueles submetidos à hemodiálise crônica(10), têm produção aumentada de espécie reativa ao oxigênio (11), ou simplesmente, radicais livres que superam a capacidade antioxidativa orgânica, instalando-se EO(12). Os radicais livres(RLs) e EROs são responsáveis pela ativação do fator nuclear kappa B(FN-kB) responsável pela transcrição gênica de citocinas pro e inflamatórias, quimiocinas (controlam o tráfego basal e inflamatório de leucócitos por meio de quimiotaxia) e moléculas de adesão (13).

As citocinas(citoquinas ou cytokines) são proteínas solúveis, de baixo peso molecular, secretadas por leucócitos e outras células do organismo, principalmente em resposta a estímulos antigênicos, atuando como mensageiros do sistema imune(14). As citoquinas que agem em outros leucócitos são denominadas interleucinas (IL)(14).

Pelo menos metade dos pacientes DRCHD são portadores de ISC denunciada pela presença elevada da PCR e ou interleucinas(IL) inflamatórias IL-1, IL-6, fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), IL-12 e IL-18, produzidas pelo sistema imune em resposta ao processo hemodialíticos e urêmico(8). Assim a inflamação é provavelmente a situação clínica mais comum associada aos DRC, especialmente os hemodialíticos(HD)(8).

A disfunção testicular em DRCHD é frequentemente estudada sob a ótica hipogonadismo clínico ou subclínico através do estudo dos hormônios sexuais (níveis séricos de FSH, LH e Testosterona) e alterações identificadas no espermograma (baixa qualidade seminal). Para estas alterações são atribuídas,

predominantemente, os efeitos dos fatores urêmico, hormonal, oxidativo e inflamatório(15).

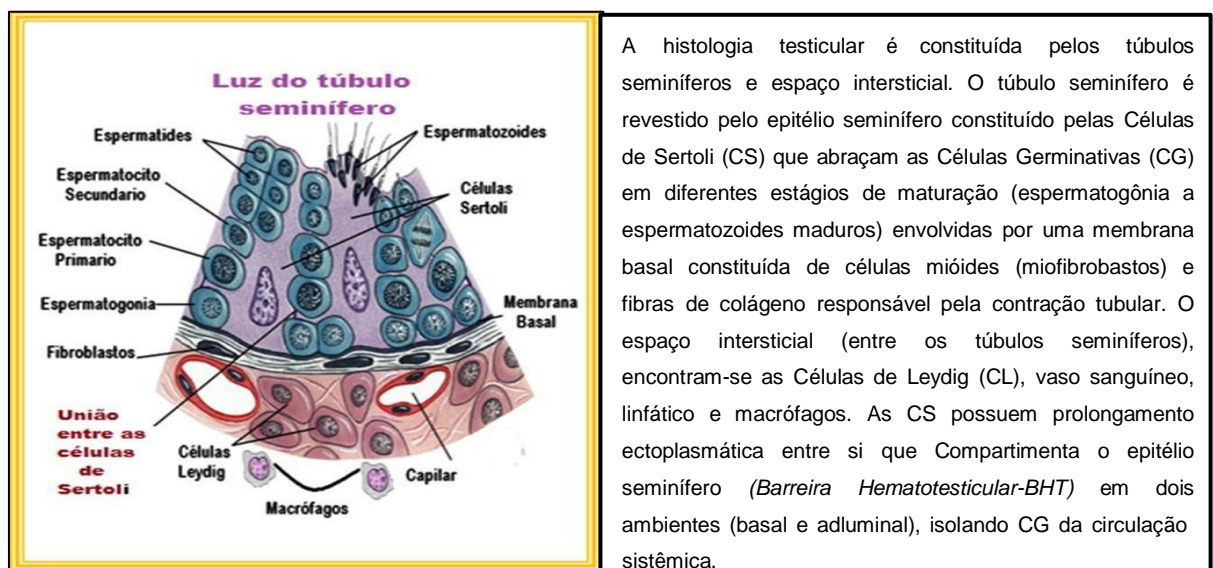
Por outro lado, estudos têm avançado na identificação de marcadores biológicos no plasma seminal associados à qualidade seminal que possam refletir os efeitos diretos ou indiretos destes fatores sobre a gônada(16, 17).

Considerando que 40-60% dos DRC submetidos à HD são acometidos por ISC denunciada pela elevação sérica de PCR e ou IL-6(18), resolveu-se investigar o possível efeito da inflamação sistêmica sobre a função testicular, analisando-se no sêmen duas proteínas secretadas na gônada sensíveis à inflamação sistêmica e local e associadas ao complexo processo de espermatogênese: a transferrina seminal(Tfs) e ferritina seminal(Fts).

São atribuídos à Tfs a capacidade de refletir o *status* da função testicular em estudos de infertilidade e guardar relação direta com o número de espermatozoides, sendo considerada com índice de função testicular(19, 20).

1.3 ANATOMOFISIOLOGIA TESTICULAR

1.3.1 Histologia Testicular



A histologia testicular é constituída pelos túbulos seminíferos e espaço intersticial. O túbulo seminífero é revestido pelo epitélio seminífero constituído pelas Células de Sertoli (CS) que abraçam as Células Germinativas (CG) em diferentes estágios de maturação (espermatogônia a espermatozoides maduros) envolvidas por uma membrana basal constituída de células mioídes (miofibroblastos) e fibras de colágeno responsável pela contração tubular. O espaço intersticial (entre os túbulos seminíferos), encontram-se as Células de Leydig (CL), vaso sanguíneo, linfático e macrófagos. As CS possuem prolongamento ectoplasmática entre si que Compartimenta o epitélio seminífero (*Barreira Hematotesticular-BHT*) em dois ambientes (basal e adluminal), isolando CG da circulação sistêmica.

Figura 1 Anatomofisiologia dos túbulos

A gônada masculina está sob comando direto da ação hormonal do FSH e LH, estimulando, respectivamente as CS a produzirem substâncias necessárias à maturação das CG e controle homeostático local (pelas citocinas); e as CL a produzirem testosterona e outras substâncias sinalizadoras locais(21).

Para melhor exercer suas duas funções principais (espermatogênese e esteriodogênese), a glândula testicular é bi compartimentada (em ambiente intersticial (ou basal) responsável pela esteriodogênese (CL) e tubular (ou adluminal), onde ocorrem a diferenciação das CG, conforme Figura 1(22).

A divisão destes dois ambientes é importante para espermatogênese por criar um ambiente ideal para diferenciação das células germinativas, isolando-as do sistema imunológico corporal ou sistêmico(23).

Devido à organização peculiar do epitélio seminífero por conta da diferenciação ectoplasmática das CS, formando a BHT e outros mecanismos de regulação local como a regulação autócrina(células são autorreguladas por substâncias produzidas por si mesmas) e parácrina(células produzem citocinas que regulam funções de células vizinhas)(24). Estes mecanismos juntos dotam o testículo da condição imunoprivilegiada para resistir às agressões do compartimento extra celular e garantir a maturação completa das células germinativas durante a espermatogênese(24).

1.3.2 Funções “*Nurses*” das Células de Sertoli

Além de bi compartimentar o epitélio seminífero, as CS ocupam grande área no epitélio seminífero (15 a 19%) e exercem diferentes funções igualmente importantes, a saber, todas direcionadas para cuidar/proteger (*nurse*) as CG das agressões imunológicas provenientes do espaço intersticial testicular como(22):

- a) suporte estrutural a citoarquitetura do epitélio seminífero;
- b) forma a BHT (garante impermeabilidade/ barreira imunológica);
- c) participa da movimentação das CG até lúmen;
- d) cuidar (*nurse*) das CG; proteção física contra anticorpos da circulação sistêmica; fornecimento de nutrientes e outras substâncias secretados como(22):
 - proteases e inibidores de proteases: catepsina, cistatina C, α 2-macroglobulina;

- transferrina e ferritina e íon; hormônio como estradiol 17- β ;
- Fatores de crescimento, autócrino e parácrino: TGF α e β (fator de crescimento tecidual); e Substratos energéticos: aminoácidos, carboidratos, lactato, lipídeos, vitaminas.

1.3.3 Regulação Neuro-Imuno-Endócrina Testicular: Papel das Citocinas

As citocinas ou hormônios do sistema imune têm amplos efeitos biológicos como mensageiros imunológicos.

Os dois efeitos principais destes mediadores imunológicos nos testículos são(25, 26):

- a) Mediar às respostas endócrino-imunes durante os processos inflamatórios locais ou sistêmicos; e
- b) Funciona como fator de crescimento e de diferenciação celular na orquestrada interação entre as células que compõem o epitélio germinativo (CG, CS e CL) durante os eventos fisiológicos da espermatogênese.

Existir uma semelhança entre os sistemas hematopoiético e epitélio seminífero(27). Ambos são responsáveis por proverem de populações celulares com funções definidas durante toda vida (hemácias/espermatozoides) com capacidade de auto renovação que suprem continuamente de células novas nos processos de hematopoese e espermatogênese de seus órgãos de origens, medula óssea e testículo(27).

Desde muito tempo é conhecido o efeito depressor da inflamação/infecção crônica sistêmica ou local sobre a capacidade reprodutiva (alterações de fertilidade) por vários mecanismos entre os quais a diminuição dos níveis de testosterona por interferência na esteriodogênese glandular(28).

A espermatogênese testicular é um processo complexo sob controle de fatores endócrino, autócrino e parácrino(29).

- *Controle sistêmico ou endócrino*: corre no EHHG na qual envolve o clássico circuito de secreção do hormônio liberador de gonadotrofina(GnRH) hipotalâmica que estimula a hipófise a produzir e secretar gonadotrofinas(LH e FSH) com ação nas células alvos, as gônadas masculinas ou femininas(27). As CS promovem

síntese e secreção de substância como transferrina, ferritina, lactato, citocinas ditas pró-inflamatórias (fator de necrose tumoral-TNF, IL-1 e IL-6) e Inibina. As CL promovem síntese e secreção de testosterona e outros produtos parácrino (citocinas). Estas proteínas e hormônios secretadas fazem *feed back* em alça longa modulando as descargas de GnRH, LH e FSH(27).

- *Controle local ou parácrino/autócrino*: este sistema regula a espermatogênese local e modular a resposta glandular ao controle endócrino sistêmico. Fatores parácrinos são substâncias (produtos) produzidos por um tipo de célula com ação sobre outra célula do mesmo órgão(30).

Fatores autócrinos são substância (produto) produzido por um tipo de célula com ação sobre si mesma(30). Esteroides, proteínas e vários peptídeos têm sido identificados como fatores parácrinos/autócrinos produzidos e secretados por vários tipos celulares testicular (CG, CS e CL) com fim de controle local(30)

Estes três grupos celulares têm a capacidade de interagirem entre si através de sinalização célula-célula ou através da produção local de citocinas (mec. parácrino/autócrino)(31). De forma harmônica este grupo celular mantêm homeostasia ou permitem mínimas alterações do meio testicular em situações adversas (inflamação/infecção sistêmica ou local) sem interferir de modo significativo no processo de maturação das células germinativas(24).

1.3.4 Sistema de Suprimento de Íon às Células Germinativas

O íon Ferro é essencial à vida dos seres eucariontes e maioria dos procariontes por ser importante para diversas função biológicas nesses seres, dentre elas de compor sistemas enzimáticos responsáveis pelo fornecimento energético às CG(32).

Nos túbulos seminíferos existe um sofisticado sistema de *captação* (através dos Receptores Solúveis de Transferrina-RSTf) na superfície das CS que têm contato com o compartimento basal do túbulo seminífero; de *transporte* (Tfs) e *estocagem* (Fts) de íon na forma solúvel e atóxica(33). O Ferro é captado na superfície das CS pelos RSTf e armazenado no citosol (na molécula de Ft) ou é transportado pela Tfs até o compartimento adluminal do epitélio seminífero onde é liberado às CG possuidoras de RSTf de membrana(33).

O mecanismo pelo qual a Tfs e Fts são encontradas no líquido seminal é desconhecido, admitindo-se que sejam um produto secretório das CS(34).

A figura 2 mostra o modelo proposto por Sylvester e Griswold explicitando o transporte de íon nas CG(35).

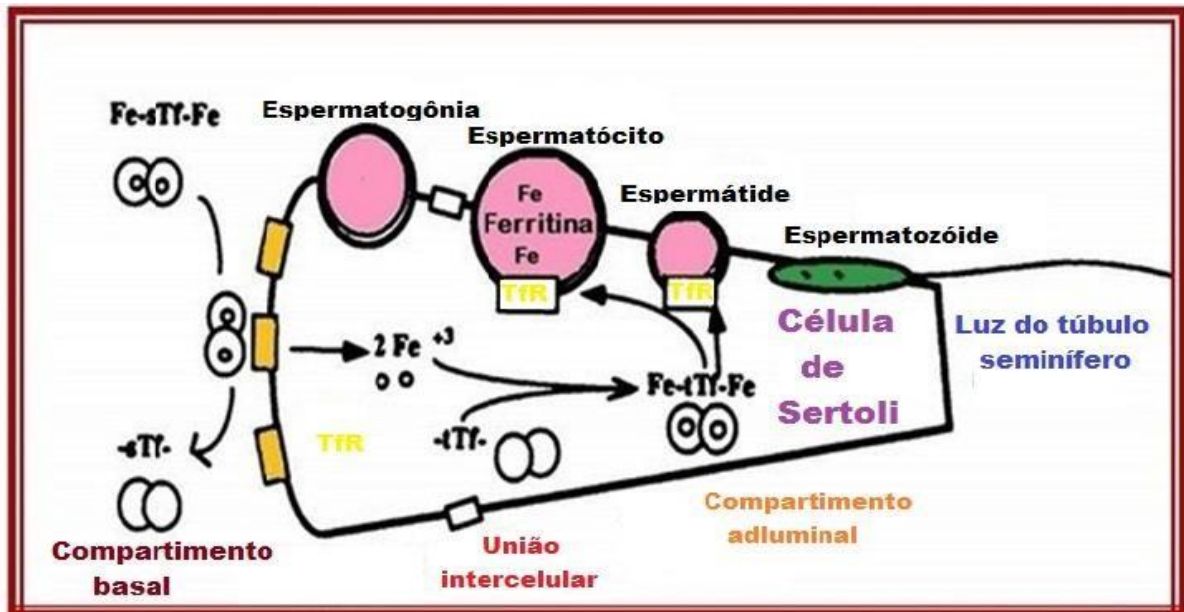


Figura 2 Modelo de suprimento de íons ferro às células germinativas proposto por Sylvester e Griswold (*J Androl.* 1994 Sep-Oct; 15(5):381)

1.4 EVIDÊNCIAS DE SECREÇÃO DE FERRITINA E TRANSFERRINA PELA GÔNADA MASCULINA

A ferritina (Ft) está presente nas CS que compõe o epitélio germinativo dos túbulos seminíferos e nas CL situadas no compartimento intersticial tubular, tanto em mamíferos, incluindo o homem; quanto em roedores(36).

Wise et al(37) estudando a relação do peso testicular de bovinos com a cor da superfície de corte dos testículos, verificaram que os testículos com maiores intensidades de tonalidades marrons correspondiam àqueles com maior quantidade de ferro armazenada na proteína Ft no citoplasma celular por análise imunohistoquímica, quando comparado com aqueles de tonalidades mais claras.

Observaram também maior reatividade de marcação nas CL, quando comparada com as CS.

Similar resultado obteve Koeva et al(38) quando estudou a imunoreatividade da Ft, também por técnica de imunohistoquímica, em seis testículos humanos fruto de orquiectomia para controle de adenocarcinoma de próstata, em pacientes com idades entre 34-56 anos, verificou forte reatividade à Ft no citoplasma das CL e moderada nas CS.

Kwennang et al(38) estudando o efeito antioxidativo no plasma seminal humano mediado pelo Fe, Cobre (Cu) e Ft em 30 estudantes jovens saudáveis (férteis) e 30 inférteis com severas teratogênias no espermograma, não encontraram diferença significantes entre os níveis de Fts nos dois grupos mensurados por pelo método ELISA: 90 ± 68 ng/ml; 101 ± 61 ng/ml, respectivamente, para férteis e inférteis. Não foi identificado na literatura médica a mensuração da Ft no sêmen de portadores de RCHD.

A Tfs é encontrada no líquido seminal em grande concentração como produto secretório das CS(39). Estudos realizados em pacientes com suspeita clínica de sub/infertilidade em população não urêmica, sugerem que seus níveis estão diretamente relacionados com parâmetros seminais, especialmente número de espermatozoides, sendo seus níveis seminais considerado por muitos como índice de função testicular(19, 20).

1.5 SISTEMA ANTIOXIDATIVO

Manter os RLs em níveis fisiológicos no meio interno é função sistema antioxidativo. Diariamente RLs são produzidos no organismo (endógeno) como resultado de processos biológicos naturais de oxirredução celular (respiração, vias metabólicas, reações enzimáticas) e resposta à inflamação e doenças(40). Ou de fontes externas de origem exógena como drogas, poluição, tabaco(40).

Os principais RLs de importância clínica são o ânion superóxido (O_2^-) de origem endógena; peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila (OH^-)(41).

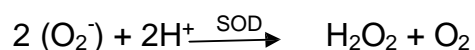
A hidroxila é particularmente instável e reage rápida e aleatoriamente com a maior parte das moléculas biológicas, causando peroxidação lipídica, inativação enzimática e mutações de DNA(40).

O sistema antioxidativo é constituído em sua essência por enzimas(Sistema Antioxidativo Enzimático) e auxiliado por um grupo heterogêneo de substâncias(Sistema Antioxidativo Não- Enzimático) que se complementam nas funções de destruição ou inativação do excesso de RLs gerados no meio interno(42).

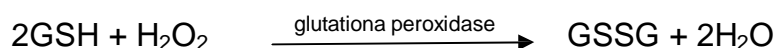
1.5.1 Sistema Antioxidativo Enzimático

É composto por um grupo de enzimas com alta capacidade de neutralizar/eliminar os RLs gerados no organismo representadas por três enzimas principais(40):

As superóxido dismutases (SOD) são enzimas que contêm metal e que catalisam a conversão de dois superóxidos em oxigénio e peróxido de hidrogénio, que é menos tóxico que o superóxido e a catalase (CAT), localiza nos peroxissomas, degrada o peróxido de hidrogénio em água e oxigénio(40), completando assim a reação iniciada pela SOD, conforme as reações abaixo:



A terceira enzima importante neste processo é glutathiona peroxidase(GSH) que atua também na degradação do peróxido de hidrogénio, originando água e a forma oxidada da GSH (GSSG)(40), de acordo com a equação:



A glutathiona transferase, ceroplasmina ou hemoxigenase, podem também participar do controle dos níveis de RLs e seus subprodutos no meio interno(40).

1.5.2 Sistema Antioxidativo Não-Enzimático: Papel das Proteínas Ferritina e Transferrina Seminal

O sistema não-enzimático é um sistema secundário e complementar do sistema antioxidativo enzimático na eliminação/inativação dos RLs constituído por(43):

a) Conjunto heterogêneo de substâncias como carotenoides, flavonoides, vitaminas A, C, E, K, ácido úrico, compostos fenólicos e outros capazes de inativá- los ou reduzir sua capacidade oxidativa através da doação de elétrons aos RLs; e

b) Proteínas de depósito ou transporte de íon ferro (ferritina/transferrina) que atuando na regulação da concentração de íon ferro no intracelular por meio de sequestro(quelação) do excesso de íons ferro no citosol celular, evitando o efeito tóxico celular do íon(43).

O possível efeito antioxidativo destas proteínas(Ft e Tf) decorrem de suas capacidades de manter em nível ótimo no meio intracelular as concentrações de íon ferro, pois este catalisar a reação de Fenton(44), responsável pela formação do radical hidroxila (HO^-), conforme equação abaixo.

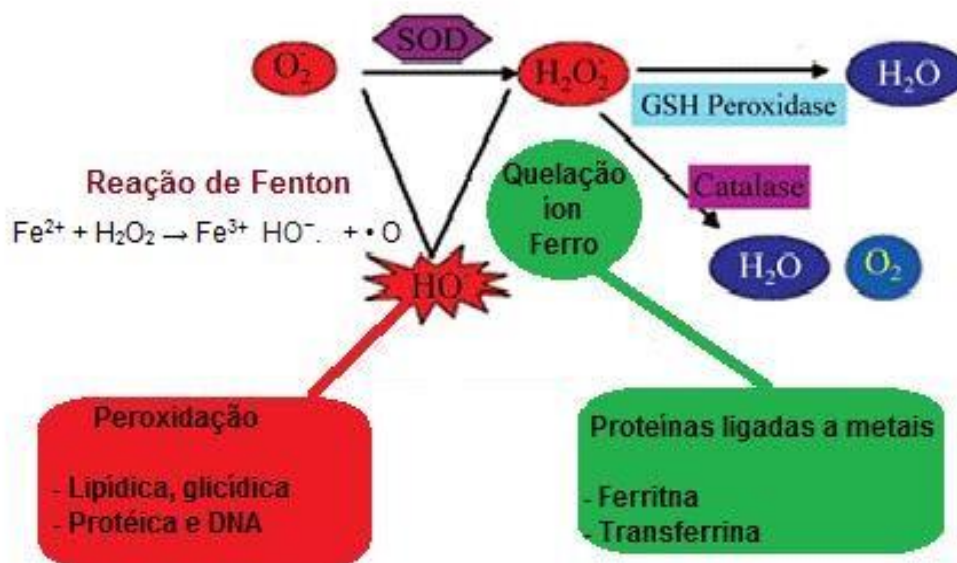


Figura 3 Sistema antioxidativo enzimático e metaloproteínas
 Fonte: Próprio Autor

A Figura 3 mostra os principais mecanismos do sistema antioxidativo (enzimático e não-enzimático), incluindo o possível papel antioxidante (por quelação de íon ferro) das proteínas (Ft e Tf).

1.6 HIPÓTESE

Que a inflamação sistêmica pode alterar no compartimento testicular os níveis seminais ferritina e transferrina e justificar em parte as alterações de qualidade seminal devido à propriedade antioxidativa atribuída a estas proteínas.

1.7 JUSTIFICATIVA

Contribuir para o melhor entendimento dos possíveis mecanismos envolvidos nas alterações de baixa qualidade seminal manifestadas clinicamente por suspeita de subfertilidade/infertilidade frequentemente evidenciadas deste grupo de paciente. Estudos até então existentes atribuem estas alterações essencialmente aos fatores urêmico, oxidativo e hormonal. O presente estudo inova por acrescentar conhecimento sobre o possível efeito da inflamação sistêmica, tão prevalente nestes pacientes, sobre os níveis das proteínas seminais ferritina e transferrina que lhes são atribuídos propriedade antioxidativa, sinalizando possibilidade de utilizá-las como biomarcadores de qualidade seminal.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Verificar o efeito da inflamação sistêmica crônica, definida pelo nível sérico de PCR, a nível das proteínas seminais ferritina e transferrina e se estas estão associadas à qualidade seminal em paciente renal crônico hemodialítico.

2.2 ESPECÍFICOS

- a) Determinar a concentração média de ferritina/transferrina seminal em homem adulto renal crônico em hemodiálise com e sem inflamação;
- b) Comparar parâmetros (bioquímicos, seminal e hormonal), índice de fertilidade e nível seminal de ferritina e transferrina entre caso(doente renal crônico hemodialítico) e controle(sadios);
- c) Comparar parâmetros (bioquímicos, seminal e hormonal), índice de fertilidade e níveis seminais de ferritina e transferrina entre caso/controle, segundo fator Inflamatório;
- d) Correlacionar níveis de PCR sérica com ferritina e transferrina seminal, índice de fertilidade e parâmetros (seminal e hormonal) em grupo de caso; e
- e) Correlacionar níveis seminais de ferritina e transferrina com índice de fertilidade e parâmetros (seminal, hormonal) em grupo de caso.

3 MATERIAL E MÉTODO

3.1 RECRUTAMENTO, AMOSTRA, INCLUSÃO E EXCLUSÃO

Estudo transversal realizado no Setor de Hemodiálise do Hospital Universitário da Universidade de Brasília, entre julho de 2016 e dezembro de 2016.

Critérios de inclusão foram: homens com idades de 18 a 60 anos, estando em HD há mais de 6 meses (grupo de casos), ausência de hepatopatia aguda ou crônica e eugonádicos.

Critérios de exclusão foram: presença de hemocromatose ou doenças do metabolismo do ferro.

Não foram incluídos no estudo pacientes com condições clínicas que pudessem induzir processo inflamatório agudo ou crônico e alterar nível de PCR sérica assim como alterar os níveis de ferritina/transferrina seminal como história recente de infecção do trato geniturinário, sinais clínicos de infecção / inflamação aguda ou crônica, sorologia positiva para hepatite B, C e HIV, infecção de acesso vascular, leucocitose, febre, hipoproteinemia.

A amostra foi constituída de grupo de **60 casos** de RCHD, subdivididos em três subgrupos com base no nível sérico de PCR segundo sugere K/DOQI/2006(45) - *Kidney Disease Outcomes Quality Initiative*-Plano de Qualidade dos Desfechos das Doenças Renais da Fundação Nacional do Rim em: grupo 1(n=30) - pacientes com inflamação; grupo 2(n=30) - pacientes sem inflamação, segundo nível sérico de PCR > 5mg/ml ou ≤ 5mg/ml, respectivamente, e grupo 3(grupo 1 + grupo 2).

E grupo **controles**(n=30, grupo 4), constituídos de pacientes saudáveis provenientes do ambulatório de promoção de saúde do mesmo hospital, sem alteração de fertilidade e comorbidade clínica importantes conhecidas ou portadores de inflamação clínica evidente e PCR sérica ≤ 1,0 mg/l adotada para pacientes com menor risco cardiovascular(46).

3.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

A amostra de sangue para análise foi colhida de fístula arteriovenosa imediatamente antes da primeira sessão de hemodiálise semanal no grupo de caso e em dia previamente agendado para o grupo controle.

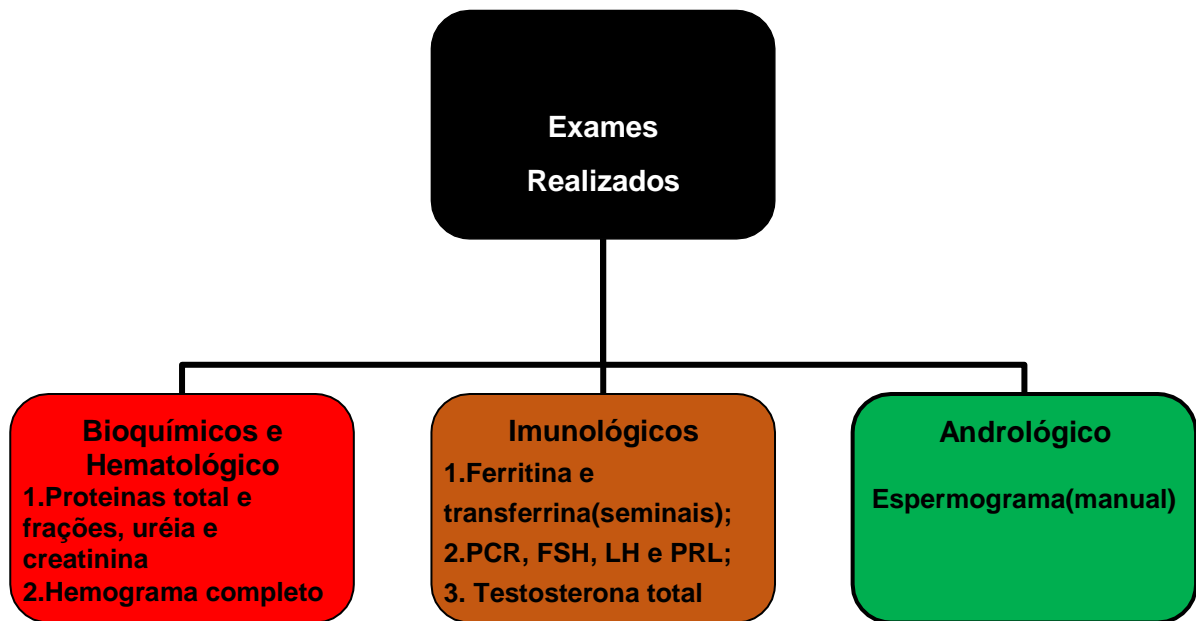


Figura 4 Exames laboratoriais realizados na pesquisa

Sempre entre às 8:00 e 10:00 horas no laboratório de análise clínica do mesmo hospital para realizar exames bioquímicos e hematológicos (hemograma completo, ureia, creatinina, proteínas total de frações), imunológicos (PCR, FSH, LH, TT, PRL, Fts e Tfs) e andrológico (espermograma), conforme Figura 4.

No mesmo dia de coleta de sangue, o sêmen foi coletado por masturbação voluntária em temperatura ambiente para realizar espermograma completo por método manual de acordo com as recomendações do manual de laboratório da Organização Mundial de Saúde (OMS, 2010) para exame e processamento de sêmen humano 5^a ed(47). A descrição técnica do espermograma pelo método manual pode ser consultada como anexo A.

Após 30 minutos destinados à liquefação seminal, foi centrifugado o conteúdo seminal a 3500 x g durante 20 min. O sobrenadante foi recolhido para um novo tubo de ensaio e mantido a -20 ° C para medir Fts, Tfs e hormônios sexuais séricos por imunoquimioluminescência enzimática usando o analisador automático *Immulite 2000 / Siemens*. Foram utilizados kits específicos para quantificação, calibração e controles recomendados pelo fabricante. A PCR sérica foi mensurada por Nefelometria no equipamento *BN II /Siemens*. Exames bioquímicos mensurados no aparelho *Archditect/ Abbott c 8000*.

3.3 ÍNDICE DE FERTILIDADE (IF)

O IF foi calculado de acordo com Harvey(48) como se segue: IF = concentração de esperma (x 10⁶/ ml) x motilidade de esperma x percentagem de espermatozoides com morfologia normal.

O Tabela 1 abaixo mostra valores normais dos parâmetros seminais adotados no presente estudo segundo a OMS ano 2010(47).

Tabela 1 – Parâmetros seminais avaliados no espermograma

Parâmetros seminais (PS)	Valores normais
Tempo de liquefação	< 60 min
Consistência ou viscosidade	Normal
pH	>7.2
Volume	>1.5 ml
Concentração de espermatozoides /ml	> 15x10 ⁶ /ml
Número total de espermatozoides	>39 x 10 ⁶ espermatozoides/ejaculado
Espermatozoides com morfologia normal	>4%
Vitalidade espermática	>58%
Motilidade total: progressiva (PR) + não progressiva (NP)	>40%

Fonte: Manual de laboratório para exame e processamento de sêmen humano (OMS 5ª ed., 2010)

O presente estudo só foi iniciado após análise do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília (CEP/FS/UnB) e receber aprovação do mesmo comitê (registrado sob nº 53172316.9.0000.0030). O parecer consubstanciado da CEP/FS/UnB pode ser consultado como anexo B.

3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Constatado curva de distribuição normal nas variáveis amostrais por teste de normalidade (*Shapiro-Wilk*), as diferenças entre duas variáveis quantitativas independentes foi utilizando o *t-test* e *anova one-way test* para três ou mais variáveis quantitativas. Para correlação entre duas variáveis quantitativas independentes, correlação de Pearson.

A significância estatística foi estabelecida com $p < 0,05$ para rejeitar a hipótese nula. Utilizado *SPSS®* para Windows, versão 24.0.

4 RESULTADOS

A idade do grupo de caso variou de 38-60 anos com média \pm DP (49,47 \pm 5,56 anos); enquanto o grupo controle teve variação similar com média \pm DP (47,90 \pm 6,22 anos), sem diferenças significativas entre grupos ($p=0,226$) (Tabela 2).

As etiologias da DRC identificadas no presente estudo foram: diabetes melitus 27(45,00%); hipertensão arterial 17(28,33%); glomerulopatia 12(20,00%) e doença congênita renal 4(06,66%).

As variáveis hematológica/bioquímicas (hemoglobina, ureia, creatinina e albumina); PS (volume, motilidade, vitalidade, densidade e morfologia); parâmetros hormonais (FSH, LH, TT e PRL), IF e Tfs foram significativamente diferentes entre caso (grupo 3) e controle (grupo 4) (Tabela 2, $p<0,001$). Não houve diferenças significativas entre caso e controle para globulina ($p=0,209$) e Fts ($p=0,139$) (Tabela 2).

O efeito inflamatório sobre as variáveis estudadas. Não houve diferença significativa entre grupo 1(PCR>5) e grupo2 (PCR \leq 5) nas médias dos valores para nenhuma das variáveis estudadas (Tabela 3).

Os grupos 1 e 2 apresentaram médias dos valores significativamente diferentes($p<0,001$) em relação ao grupo grupo 4 (controle) para todas as variáveis estudadas, exceto a Fts e globulina(Tabela 3).

Nos grupos 1 e 2, a média dos valores da hemoglobina foi significativamente menor em relação ao grupo controle(Tabela 3).

A média dos valores de ureia e creatinina foi significativamente maior nos grupos 1 e 2 quando comparados com grupo controle(Tabela 3).

As médias dos valores dos parâmetros seminais (volume, motilidade, densidade, vitalidade e morfologia) e índice de fertilidade foram significativamente menores nos grupos 1 e 2 quando comparados os do grupo 4(Tabela 3).

Nos grupos 1 e 2, a média dos valores de testosterona foi significativamente menor, mas dos hormônios FSH, LH e PRL foi significativamente maior quando se compara com grupo 4(Tabela 3).

A média dos valores de ferritina não foi diferente entre os grupos 1, 2 e 4. Contudo, a média dos valores de transferrina seminal foi significativamente menor nos grupos 1 e 2 em relação ao grupo 4(Tabela 3).

A Fts correlacionou positivamente com hormônio LH ($r=0,136$; $p=0,047$) no grupo de caso sem inflamação (grupo2) e negativamente com o hormônio PRL ($r= -0,406$; $p=0,026$) do grupo de caso considerado inflamado crônico (grupo 1). Entretanto, não se correlacionou ($p>0,05$) com as demais variáveis avaliados (IF, PS, FSH, TT e Tfs), independentemente do *status* inflamatório considerado (Tabela 4).

A Tfs correlacionou-se positivamente ($p\leq 0,001$), independente do *status* inflamatório com IF e elementos do PS (motilidade, vitalidade e densidade espermática) (Tabela 4).

A PCR (Tabela 5) correlacionou-se positivamente apenas com Fts ($r=0,475$; $p=0,008$) e à motilidade espermática ($r=0,414$; $p=0,022$) no grupo pacientes considerados não inflamados (grupo 2). Ver resultados nas tabelas a seguir.

Tabela 2 - Análise comparativa dos parâmetros avaliados ($x \pm sd$), significativo $p < 0,0$

Parâmetros avaliados	Caso(n=60)	Controle(n=30)	^a p -valor
Idade (anos)	49,47 \pm 5,56	47,90 \pm 6,22	0,229
<u>Bioquímicos e hematológico</u>			
Hemoglobina (g/dl)	12,46 \pm 0,75	14,85 \pm 0,82	<0,001
Ureia (mg/dl)	125,51 \pm 18,14	29,73 \pm 5,07	<0,001
Creatinina (mg/dl)	10,53 \pm 1,94	00,62 \pm 0,20	<0,001
Albumina (g/dl)	03,69 \pm 0,43	04,28 \pm 0,32	<0,001
Globulina (g/dl)	04,04 \pm 0,43	04,16 \pm 0,40	0,209
<u>Parâmetros seminais</u>			
Volume seminal (ml)	01,33 \pm 00,36	02,77 \pm 0,44	<0,001
Motilidade total (MP + NP, %)	34,00 \pm 06,24	71,31 \pm 7,86	<0,001
Vitalidade (%)	47,49 \pm 07,31	64,41 \pm 2,89	<0,001
Densidade ($\times 10^6$ /ml)	14,95 \pm 06,18	50,21 \pm 8,57	<0,001
Morfologia normal (%)	25,40 \pm 07,87	59,76 \pm 10,58	<0,001
<u>Proteínas seminais</u>			
Ferritina seminal (ng/ml)	226,45 \pm 51,03	241,52 \pm 30,52	0,139
Transferrina seminal (ng/ml)	40,12 \pm 08,25	73,32 \pm 06,81	<0,001
<u>Índice de fertilidade</u>	0,85(0,57)	5,54(1,3)	<0,001
<u>Parâmetros hormonais</u>			
Hormônio folículo estimulante (mIU/ml)	06,30 \pm 01,21	03,40 \pm 00,48	<0,001
Hormônio luteinizante (mIU/ml)	15,91 \pm 02,62	02,84 \pm 00,54	<0,001
Testosterona (ng/dl)	411,03 \pm 58,88	510,60 \pm 92,56	<0,001
Prolactina (ng/ml)	16,38 \pm 02,92	05,86 \pm 01,93	<0,001

MP- motilidade progressiva; NP- motilidade não progressiva; a- t test; x- média; dp- desvio padrão
 FI = densidade ($\times 10^6$ ml) \times motilidade \times morfologia, conforme descrito por Harvey (1953)

Tabela 3 - Análise comparativa dos parâmetros avaliados segundo fator inflamatório ($x \pm dp$)

Parâmetros avaliados	<u>Caso</u>		<u>Controle</u>	p ^a -valor	<u>Teste de Bonferroni</u>		
	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 4		Grupo 1 & Grupo2	Grupo1 & Grupo4	Grupo2 & Grupo4
	n(30) PCR>5ng/ml	n (30) PCR≤ 5ng/ml	n (30) PCR≤ 1ng/ml				
<u>Bioquímicos e hematológico</u>							
Hemoglobina (g/dl)	11,80 ± 0,92	12,16 ± 1,07	14,85 ± 0,85	<0,001	00,16	<0,001	<0,001
Ureia (mg/dl)	127,7±18,05	123,33±18,88	29,73 ±5,07	<0,001	00,82	<0,001	<0,001
Creatinina (mg/dl)	10,30 ± 2,12	10,75 ±1,74	00,62 ±0,20	<0,001	00,84	<0,001	<0,001
Albumina (g/dl)	03,64 ± 0,44	03,73± 0,43	04,28± 32	<0,001	01,00	<0,001	<0,001
Globulina (g/dl)	04,01±0,41	04,08±0,45	04,16±0,40	00,379			
<u>Parâmetros seminais</u>							
Volume (ml)	01,29±0,38	01,38 ±0,34	02,77 ±0,44	<0,001	01,00	<0,001	<0,001
Motilidade total (MP + NP, %)	32,36±5,94	35,63±6,20	71,31±7,86	<0,001	00,19	<0,001	<0,001
Vitalidade (%)	45,76±8,75	49,21±5,11	64,41±2,89	<0,001	00,92	<0,001	<0,001
Densidade (x10 ⁶ /ml)	13,3±4,92	16,53±6,96	50,21 ±8,57	<0,001	00,25	<0,001	<0,001
Morfologia (%)	23,30 ±6,69	27,51±8,41	59,76±10,58	<0,001	00,19	<0,001	<0,001
<u>Proteínas seminais</u>							
Ferritina seminal (ng/ml)	215,47±47,77	237,68±52,49	241,66±30,52	00,520			
Transferrina seminal (ng/ml)	37,90 ±06,22	42,35±09,46	73,32±06,81	<0,001	00,07	<0,001	<0,001
<u>Índice de fertilidade</u>	0,66(0,33)	1.05(1,3)	5,54(1,3)	<0,001	00,29	<0,001	<0,001
<u>Parâmetros hormonais</u>							
FSH (mIU/ml)	06,4±01,39	06,18±01,00	03,40±00,48	<0,001	01,00	<0,001	<0,001
LH (mIU/ml)	06,01±01,67	15,81 ±02,61	02,84±00,54	<0,001	01,00	<0,001	<0,001
Testosterona (ng/dl)	399,73±48,99	422,33±66,24	510,60±92,56	<0,001	01,00	<0,001	<0,001
Prolactina (ng/ml)	16,24 ±2,98	16,52 ±02,91	05,86 ±01,93	<0,001	01,00	<0,001	<0,001

MP- motilidade progressiva; NP-motilidade não progressiva; FSH- Hormônio folículo estimulante LH- Hormônio luteinizante; a-anova on way, IF= densidade (x 10⁶ ml) x motilidade x morfologia, conforme descrito por Harvey (1953); x- média; dp- desvio padrão

Tabela 4 - Avaliação correlacional entre níveis seminais de ferritina/transferrina, índice fertilidade, parâmetros seminais e hormonais em grupos de caso

Parâmetros avaliados		<u>Teste de Pearson - grupos de caso</u>						
		Grupo 1		Grupo 2		Grupo 3		
		n (30)		n (30)		n (60)		
		r-valor	p-valor	r-valor	p-valor	r-valor	p-valor	
Ferritina seminal ⊗	Índice de fertilidade	-0,098	0,607	0,038	0,843	0,020	0,876	
	<u>Parâmetros seminais</u>							
	Motilidade espermática	-0,087	0,647	-0,050	0,793	-0,005	0,971	
	Vitalidade espermática	-0,306	0,101	0,077	0,685	-0,088	0,504	
	Densidade espermática	-0,292	0,117	0,760	0,688	-0,007	0,960	
	Morfologia normal espermática	0,088	0,643	-0,169	0,371	0,003	0,980	
	<u>Parâmetros hormonais</u>							
	Hormônio folículo estimulante	0,086	-0,652	-0,310	0,096	-0,106	0,421	
	Hormônio luteinizante	-0,294	0,114	0,136	0,047	-0,078	0,554	
	Testosterona	0,109	0,567	-0,167	0,386	-0,009	0,948	
	Prolactina	-0,406	0,026	-0,028	0,882	-0,194	0,137	
	Transferrina seminal	-0,074	0,697	0,018	0,923	0,038	0,773	
	Índice de fertilidade	0,866	<0,001	0,704	<0,001	0,754	<0,001	
	Transferrina seminal ⊗	<u>Parâmetros seminais</u>						
Motilidade espermática		-0,866	<0,001	0,859	<0,001	0,857	<0,001	
Vitalidade espermática		0,853	<0,001	0,618	<0,001	0,532	<0,001	
Densidade espermática		0,803	<0,001	0,821	<0,001	0,827	<0,001	
Morfologia normal espermática		0,449	0,013	0,272	0,146	0,374	0,003	
<u>Parâmetros hormonais</u>								
Hormônio folículo estimulante		0,015	0,937	0,008	0,967	-0,014	0,916	
Hormônio luteinizante		-0,122	0,521	0,006	0,973	-0,014	0,680	
Testosterona		-0,118	0,533	-0,082	0,667	-0,042	0,749	
Prolactina		-0,077	0,687	0,024	0,899	-0,005	0,967	

Tabela 5 – Avaliação correlacional entre nível sérico de PCR e níveis seminais de ferritina e transferrina, índice fertilidade, parâmetros seminais e hormonais em grupo de caso ($p < 0,05$; significativo)

	Parâmetros avaliados	Teste de Pearson	
		r-valor	p-valor
Proteína c reativa &	Ferritina seminal	-0,198	0,130
	Transferrina seminal	-0,166	0,204
	Índice de fertilidade	-0,238	0,067
	Motilidade espermática	-0,224	0,086
	Vitalidade espermática	-0,183	0,162
	Densidade espermática	-0,153	0,180
	Morfologia normal espermática	-0,175	0,154
	Hormônio folículo estimulante	0,120	0,361
	Hormônio luteinizante	0,076	0,561
	Testosterona	-0,186	0,156
	Prolactina	-0,067	0,611

*Teste de Pearson

5 DISCUSSÃO

Este é o primeiro estudo identificado que avalia possível aplicabilidade, na prática clínica diária de paciente RCH, o uso da ferritina e transferrina seminal na avaliação inicial daqueles que se apresentam com suspeita clínica de sub/infertilidade por possíveis alterações da qualidade seminal. A praticidade e o custo relativamente baixo de mensuração destas proteínas no plasma seminal, torna-as atrativas como método de investigação. Este estudo acrescenta conhecimento valiosos sobre as alterações de qualidade seminal identificadas nestes pacientes, verificando o possível efeito da inflamação sistêmica na qualidade seminal, prevalentes nestes pacientes, via alterações dos níveis seminais das proteínas ferritina e transferrina sensíveis ao fator inflamatório sistêmico.

Alteração de fertilidade é uma condição clínica que afeta cerca de 15% dos casais em geral em idade reprodutiva com contribuição do fator masculino não menos que 50% dos casos(49).

A prevalência da população HD de alteração de PS é pouco estudada. Prem et al(50) em uma população de hemodialítica de 19 homens(22-41 anos) verificou que mais de 40% deles eram portadores de oligospermia e azoospermia.

5.1 ANÁLISE DA ANEMIA, HIPOABUMINEMIA E FATOR IDADE

5.1.1 Anemia

É prevalente e variada nos paciente com DRCH(51). No presente estudo, definiu-se anemia para homem adulto $Hgb < 12g/dl$. Com este ponto de corte, identificou-se 21,66% dos casos estudados apresentaram $Hgb < 12g/dl$ com variação média $12,46 \pm 0,75g/dl$. Estudo de prevalência realizado na população americana (Estados Unidos da América) portadora de DRC nos anos 2007-2010 com anemia definida para homens ($Hgb < 13g/dl$) e para mulher ($Hgb < 12g/dl$), encontraram prevalência de anemia de 14% deles, sendo duas vezes mais prevalente na

população urêmica que na população geral (15.4% vs 7.6%) e variando conforme os 5 estágios da DRC(conforme taxa de filtração glomerular): 8.4%(estágio 1) até 53.4%(estágio 5)(52).

Resultado semelhante obteve Ryu et.al(53) na Ásia (Korea), onde encontraram prevalência geral de anemia de 45.0%(considerou Hgb<13g/dl para homens e Hgb<12g/dl para mulheres) em população renal crônica não dialítica de 2.198 casos em estágios de 1 a 5.

Dados da Sociedade Brasileira de Nefrologia de 2012 demonstrou que 34,4% dos pacientes em hemodiálise apresentam anemia, considerando-se anemia Hgb < 11 g/dl(54).

As principais causas da anemia neste grupo de pacientes incluem diminuição da produção de eritropoietina renal, sensibilidade diminuída das células hematopoiéticas à eritropoietina, má nutrição, perdas sanguíneas, toxinas urêmicas (55) e principalmente, “anemia da inflamação”, observada em situações como infecções crônicas, neoplasias, traumas e desordem inflamatórias diversas como DRC(56).

Evidências experimental em animais e humanos demonstram que a condição inflamatória crônica manifestada pela elevação de citocinas inflamatórias com a IL-6, induzem hepatócitos a aumentarem a produção de *hepcidin* (hormônio regulador da homeostasia de íon ferro no plasma)(57, 58). Este peptídeo modula a síntese de proteínas de transporte(transferrina) e armazenamento(ferritina); diminui a liberação do íon ferro do sistema retículo endotelial(macrófago) e inibe absorção intestinal de íon ferro, levando à diminuição das concentrações do ferro sérico(59).

5.1.2 Hipoalbuminemia

Hipoalbuminemia definida como nível sérico de albumina < 3,5g/dl)(53) é outra condição clínica não incomum encontrada nestes pacientes devido ao estado inflamatório crônico de baixo grau presente como parte da síndrome multifacetada conhecida como MIA(mal nutrição, inflamação e aterosclerose)(60).

Dentre as hipóteses para explicar a Hipoalbuminemia nestes pacientes, admite-se que as citocinas pró-inflamatórias (IL-1, IL-6 e TNF α) geradas no

processo inflamatório crônico, diminuem a síntese de proteínas reativas de fase aguda negativa como albumina(61).

Outros fatores contribuem para o estado de Hipoalbuminemia como alterações má distribuição corporal(hipervolemia/hemodiluição), alteração na velocidade de síntese e degradação da albumina(*turnover*), insuficiência hepática e renal e perdas externas durante o processo hemodialítico não devem ser negligenciadas (62).

No presente estudo, o grupo de caso apresentou prevalência de hipoalbuminemia (<3,5g/dl) em 1/3(33,33%) com variação média de $03,69 \pm 0,43$ g/dl (Tabela 2).

A prevalência de Hipoalbuminemia em pacientes hemodialíticos no Brasil é bastante variada. Segundo censo de 2012 da Sociedade Brasileira de Nefrologia variou de 15 a 85,3%, atribuída principalmente a diferentes valores de referência adotados para definição(diagnóstico) de Hipoalbuminemia e características específicas das populações estudadas(62).Neste censo encontraram uma prevalência média de Hipoalbuminemia(<2,5g/dl) de 15,2% em hemodialíticos(54).

5.1.3 Fator Idade

O fator idade é uma variável de impacto significativo na avaliação muitas variáveis biológicas, inclusive a fertilidade humana. Com o envelhecimento, distúrbios notáveis no eixo reprodutivo evidenciados em ambos os sexos são identificados, seja por alterações endócrinas ou morfofuncionais glandular próprias do envelhecimento(63).

No presente estudo a idade similar ($p>0,05$) entre caso e controle minimiza efeito deste fator e dar mais credibilidade na análise e interpretação das variáveis analisadas.

Os PS observados no espermograma foram significativamente menores ($p<0,001$) no grupo de caso (grupo 3) quando comparado com grupo controle (grupo 4), mas são identificados fatores que contribuem para esta diferença.

É universalmente aceito que os níveis dos hormônios sexuais são influenciados pelo fator idade(64, 65). O envelhecimento humano é acompanhado

do declínio funcional de diferentes glândulas. Os hormônios sexuais dos DRCH aqui estudados seguem tendência observada em diferentes estudos conforme se pode observar na Tabela 6.

Tabela 6 – Parâmetros seminais e índice de fertilidade de hemodialíticos crônicos versus pacientes saudáveis evidenciados no estudo atual e anteriores

Estudos	Parâmetros seminais					Índice de fertilidade
	Volume	Motilidade	Vitalidade	Densidade	Morfologia	
	(ml)	(%)	(%)	10 ⁶ /ml	(%)	
<u>Atual</u> (2016)	01,33± 0,36 ↓ p<0,001	34,00±6,24 ↓ p<0,001	47,49± 07,31↓ p<0,001	14,95± 06,18↓ p<0,001	25,40± 07,87 ↓ p<0,001	0,85(0,57) ↓ p<0,001
Lehtihet(66) (2015)	2.08 ± 0,31 n p>0,05	8.37± 5.31 ↓ p<0,05	48.0 ± 3.53 ↓ p<0,05	22.48± 14.78 ↓ p<0,05	2.12±1.30 n p>0,05	Não avaliado
Zedan(49) (2013)	1.8±8.4 ↓ p<0,05	31.7±19.2 ↓ p<0,05	Não avaliada	12.0±46.46 ↓ p<0,05	não avaliada	Não avaliada
Long-Gen(67) (2012a)	2.74±1.52 ↓ p>0,05	29.52± .53↓ p<0,05	40.03 ± 27.51↓ p<0,05	48.00 ± 43.49↓ p<0,05	11.20 ± 7.66↓ p<0,05	0.68 (2.08) ↓ p= 0.000
Long- Gen(68) (2009b)	Não avaliada	26.8± 3.52↓ P < 0.01	18.80 ± 18.56↓ P < 0.01	33.73 ± 37.59↓ P<0,01	14.53 ± 8.20↓ P<0,01	0.23 (0.76)↓ P<0,01
Long-Gen(69) (2004c)	2.5 ± 0.4 n p<0,05	13.4 ± 3.9 ↓ p<0,05	25.4 ± 5.6 ↓ p<0,05	20.6 ± 4.5 ↓ p<0,05	16.8 ± 2.1 ↓ p<0,05	Não avaliado

n- normal; ↓ - diminuído

Alterações morfológicas e histológicas relacionadas com envelhecimento testicular como diminuição do volume, esclerose arteriolar, degeneração das células de Leydig, células de Sertoli, depleção de células germinativas e espessamento

testicular da túnica albugínea são observados em portadores de DRC(70).Estas alterações parecem estarem diretamente relacionadas ao declínio da síntese androgênica testicular por falência glandular devido à diminuição do número de CL associadas ou não às alterações no funcionamento do eixo hipotálamo hipófise gonadal(EHPG)(64).

O envelhecimento imunológico promovido pelo avanço da idade aumenta a produção de cortisol por hiper-estimulação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal com desregulação imune, contribuição para imunossenescência(71). A diminuição dos níveis séricos de hormônio do crescimento (GH) e dehidroepiandrosterona (DHEA) com envelhecimento, acentuam ainda mais o processo de imunossenescência(71).

Tanto a DHEA como GH aumentam a proliferação e atividade de mediadores celulares de imunidade ao mesmo tempo que a DHEA reduz a produção de citocinas inflamatórias (29). Redução nos níveis desses hormônios e níveis crescentes de cortisol pela hiperestimulação hipotalâmica adrenal com a idade, concorrem para manter o processo inflamatório crônico já existente (29).

Os hormônios sexuais também modulam a produção de citocinas inflamatórias(72). Estudos indicam que a transcrição e secreção do gene IL-6 são inibidas por estrogênio e andrógeno(72). É aceito que os esteroides sexuais diminuem com a idade como causa ou consequência dos níveis de citocinas inflamatórias aumentados contribuindo também para a inflamação crônica(73).

Análise microscópica das alterações degenerativas das células germinativas representadas por vacuolização nuclear e aumento de fragmentação de DNA observados no esperma com avanço da idade, reforçam a contribuição do fator idade na modificação do binômio hormônios sexuais e inflamação(74).

Outro efeito sensível do fator idade é a constatação de que a porcentagem de esperma normal, motilidade progressiva e vitalidade espermáticas diminuem em grandeza inversa com o avançar da idade(74).

Desde a última década se tem estabelecido uma relação entre idade e inflamação até o momento não bem entendida(75). Admite-se que a perda de qualidade do sêmen humano com idade pode ser explicada, pelo menos em parte, como parte do processo inflamatório sistêmico crônico que está intimamente associado a doenças crônicas degenerativas próprias do envelhecimento humano como diabetes tipo 2 e câncer(76).

O processo inflamatório crônico do envelhecimento (*inflamm-aging* ou inflamação do envelhecimento) é caracterizado por ser de baixo grau, subclínico, mediado pelos mesmos efetores evidenciados na resposta inflamatória agudo ou crônica de diferentes etiologias, mas diferindo significativamente por sua intensidade(76).

A evidência clínica do envelhecimento inflamatório humano é a constatação de níveis aumentados de mediadores inflamatórios com avançar da idade, mesmo na ausência de infecção aguda, crônica ou outra condição de estresse fisiológico(77).

5.2 FERRITINA SEMINAL VERSUS PARÂMETRO SEMINAL E ÍNDICE DE FERTILIDADE

A DRC frequentemente apresenta importantes alterações seminais tanto nos elementos celulares; quanto na composição líquida do fluido seminal(49).

Os elementos do PS avaliados através do espermograma (volume, motilidade, vitalidade, densidade e morfologia) comumente se mostram comprometidos (diminuídos) em um ou mais elementos nos paciente DRC em relação à população não urêmica em graus variados(78).

A explicação das alterações de SP observadas neste e outros grupos de pacientes com alteração de fertilidade é admitida importante contribuição do fator oxidativo na gênese destas alterações(44). Nesta visão, foram admitidas possíveis atividades antioxidativas atribuídas às proteínas estudadas(Fts e Tfs) devido suas contribuições no controle intracelular do nível íon ferro por quelação(79).

A Fts é uma isoforma da grande família de ferritinas encontradas em tecidos humanos e sensíveis a alterações inflamatórias sistêmicas ou locais(79). É encontrada em concentração não desprezível no plasma seminal humano como produto secreção das CS que respondem por 80% do conteúdo seminal(80).

À Ft é atribuída possível atividade antioxidativa devido sua função fisiológica de regular a concentração intracelular de íons ferro no meio intracelular(81). Evita a formação excessiva de Fe^{++} pela redução do ferro livre (Fe^{+++}) pelo ânion (O_2^-), não favorecendo as reações bioquímicas de Fenton e Haber-Weiss geradoras de

hidroxilo radical (\bullet OH)(81). O radical hidroxila é a forma mais reativa das EROs responsável pela peroxidação de lipídios, proteínas, glicídios e fragmentação de DNA(81).

Talvez a concentração elevada desta proteína no plasma seminal seja devida à necessidade de controle celular da grande demanda de íon ferro nos processos biológicos(82). O íon ferro faz parte centro catalítico enzimático, cofatores enzimáticos e na composição de proteínas biologicamente importantes envolvidas em processos bioquímicos de oxidação (geração de ATP), síntese de DNA, crescimento e desenvolvimento das células germinais masculinas dependentes deste íon(82).O íon ferro também é importante para múltiplas divisões mitóticas das CG masculinas durante a maturação espermática, crescimento celular e, em particular, para a mitocondriogênese(27). Além disso, as espermátides e os espermatozoides em maturação são extremamente vulneráveis ao estresse oxidativo, o que implica a necessidade de homeostase fina de íon ferro a nível do túbulo seminífero(27).

Embora a atividade antioxidativa da ferritina seja admitida em tese, sua evidência na prática clínica é questionada, considerando o número limitado de estudos sobre o tema.

Kwenang et al (83) analisaram níveis de ferro, cobre e ferritina em plasma seminal de jovens estudantes saudáveis ($n = 30$) e sujeitos de infertilidade ($n = 30$) com teratospermia grave, não encontraram diferenças significativas entre eles.

Por outro lado, Ferreira et al(84) analisando a capacidade oxidativa / antioxidante do plasma seminal de 69 homens com suspeita de infertilidade e sua associação com os níveis de ferro e Fts, verificaram correlação positiva entre Fts e capacidade antioxidante total ($p = 0,005$) e correlação negativa com índice EO ($p = 0,02$, $r = -0,3229$). Eles concluíram que a medição de Fts pode ser útil na avaliação do estado oxidativo / antioxidante seminal em estudos de fertilidade e EO seminal.

No presente estudo todos os elementos avaliados do PS se mostraram diminuídos em relação à população não urêmica ($p < 0,001$, Tabela 2). Apesar da diminuição uniforme dos constituintes seminais aqui observada, estudos similares de outros autores mostram um ou mais PS inalterados, conforme pode ser observado no Tabela 6 que compara PS de populações HD e não urêmica.

O *volume seminal* médio neste estudo apesar de reduzido, foi maior ao evidenciado por Zedan(49) e menor ao encontrado por Long-Gen(67). Por outro

lado, Lehtihet(66) e Long-Gen(69) encontraram volumes espermáticos dentro dos limites de normalidade(Quadro2). Alterações hormonais local e sistêmica associadas às evidências histológicas de fibrose intersticial com estreitamento de luz de túbulo seminífero, ductos epididimários e eferentes , podem explicar parcialmente a redução do volume seminal nestes pacientes(85).

A *motilidade e morfologia* espermática aqui encontradas foram maiores em relação aos estudos anteriores, apesar de diminuídos em relação aos valores normais (Tabela 6).

A *vitalidade e densidade* espermáticas também tiveram valores médios maiores em relação a estudos anteriores, exceto, em relação aos estudos de Lehtihet et al(66) e Long-Gen(69), respectivamente(Tabela 6).

As causas das alterações encontradas no PS destes pacientes são variadas, ressaltando-se os fatores urêmico, imunológico, inflamatório, oxidativo e até genético, concorrentes ou não(86).

Fator urêmico, para alguns autores (através do efeito direto das toxinas urêmicas sobre as CG, é o maior determinante das alterações encontradas no PS nestes pacientes(86). Efeito adverso da toxina urêmica sobre a integridade estrutural e funcional dos espermatozoides é uma das principais causas de infertilidade em pacientes urêmico(87). Secundariamente, o fator urêmico promove outras alterações não menos importantes como:

- bloqueio do EHHG resultando em níveis sub-ótimo testosterona e níveis elevados de LH, FSH e prolactina(88);
- inibição direta de atividade de enzima esteroidogênica, a 17-beta-hidroxiesteróide-desidrogenase(89); e
- alterações histológicas importantes (hipoespermatogênese, paragem de maturação ou aplasia de células germinativas, fibrose e calcificações do tecido gonadal)(90).

RLs gerados em excesso na DRC é outro responsável pelas alterações seminais identificadas(91). Por outro lado, RLs gerados em condições fisiológicas como na maturação de espermatozoides, dos leucócitos seminal e processos biológicos de oxi-reduções biológicas, têm funções fisiológicas importantes de sinalização celulares em diferentes processos biológicos(91).

Nível fisiológico de RLs são essenciais para mediar a fosforilação da tirosina necessária para capacitação de espermatozoides e manter o cumprimento dos telômeros(91).

Já ao excesso de RLs no meio interno, são atribuídas alterações importantes que concorrem para instalação de estados de sub/infertilidades como(92, 93):

- Fragmentação de DNA com oxidação de componentes dos nucleotídeos e alterações na replicação, reparo e transcrição de RNAm;
- Acelerar o processo apoptótico das células germinativas com declínio da quantidade de espermatozoides;
- Peroxidação de membranas lipídicas e proteicas com alteração na permeabilidade da membrana, favorecendo entrada de substâncias indesejadas para o interior celular e interferência direta na vitalidade e motilidade espermática.

Acrescenta-se que os espermatozoides são mais vulneráveis ao EO e portanto dano oxidativo do DNA, uma vez que estas células possuem mecanismos de defesa antioxidantes limitados e limitada capacidade de detecção e reparo de danos do DNA(93).

O índice de fertilidade(IF)(Tabela 2), outra ferramenta de análise de qualidade seminal, foi significativamente menor no grupo de caso em relação ao grupo controle ($p = <0,001$), corroborado com resultados obtidos por outros autores em estudos similares. Xu et al(68) estudando qualidade do sêmen em (40) pacientes urêmicos, (40) pacientes renais transplantados e (40) homens saudáveis e férteis, encontraram maior IF para pacientes saudáveis em relação aos grupos transplantados A e B e urêmico, respectivamente, 13,02 (14,26); 5,53 (8,30); 9,27 (22,49) e 0,23 (0,76). Xu et al. (94) avaliando o efeito da uremia na qualidade do sêmen e a função reprodutiva de 53 pacientes urêmicos terminais, comparando-os com 46 homens férteis e infértil como grupo controle. Eles verificaram que a motilidade, vitalidade, densidade e morfologia dos 46 pacientes urêmicos restantes foram significativamente menores que os controles. Neste mesmo estudo o IF 0,68 (2,08) do grupo urêmico foi menor em relação aos grupos férteis 7,7 (13,51) e inférteis 4,13 (5,77).

Considerando o pouco conhecimento dos mecanismos que conduzem à baixa qualidade de sêmen e ausência de correlação evidenciada entre nível de Fts e IF ou PS no grupo de pacientes estudados (Tabela 4), é plausível hipotetizar que outros mecanismos estejam envolvidos e possam ajudar explicar estas alterações seminais evidências vias diferentes fatores associados à DRC como, além da uremia, como ISC, EO ou ambas por mecanismos diversos (2).

O nível semelhante de Fts no grupo de casos e controle identificado no presente estudo pode ser parcialmente justificado pela manutenção em equilíbrio do estado de imunotolerância testicular às condições adversas sistêmicas (fatores urêmicos, IS, SO, isolados ou associados) responsável pelo *status* de privilégio imune testicular (78).

O *privilégio imune testicular* é um mecanismo complexo desenvolvido no compartimento testicular para manter o equilíbrio local dos níveis de citocinas pró / anti-inflamatório(95), envolvido na regulação da síntese de Fts(96) e nível de íon de ferro intracelular através das(PRIs)(97).

Mecanismos adicionais não menos importantes como as interações morfofuncionais entre CG, CS e as CL, conhecidas como regulação autócrina / parácrina e a BHT também fazem parte do mecanismo do privilégio imune testicular, protegem as CG do efeito inflamatório / oxidativo / toxicidade iônica(98).

A desregulação homeostática de um desses mecanismos pode explicar, em parte, a gênese das alterações seminais verificadas nestes pacientes.

Os resultados aqui obtidos sugerem que os níveis de Fts não estão associados a alterações de parâmetros seminal em pacientes submetidos à hemodiálise crônica e não são úteis isoladamente para avaliação inicial de PS.

5.3 TRANSFERRINA SEMINAL VERSUS PARÂMETRO SEMINAL E ÍNDICE DE FERTILIDADE

A exemplo da ferritina seminal(Fts), a transferrina seminal(Tfs) é uma isoforma da família de transferrina humana, encontrada abundantemente no plasma seminal humano, produzida e segregada (80%) pelas CS(22). Também é sensível às alterações inflamatórias sistêmicas e locais e envolvida no transporte de íons ferro nos compartimentos sistêmicos e testicular(99).

Além desta função, estudos sugeriram sua potencial associação com SP, sendo considerada por alguns autores como glicoproteína biomarcadora de função testicular nos anos 80 e 90(22, 99).

O presente estudo verificou níveis significativamente mais baixos no grupo de caso quando comparado ao grupo controle para Tfs ($p = <0,001$), IF ($p = <0,001$) e

todos os parâmetros celulares avaliados no espermograma ($p < 0,05$) (Tabela 2) e correlação positiva entre Tfs, IF e PS (Tabela 4).

A relação de Tfs com motilidade total de espermatozoides e índice de fertilidade pode ser explicada em até 70,1% (R^2) e 61,9% (R^2) dos casos, respectivamente, pelo modelo de regressão linear. Isto reforça a hipótese de sua possível associação com elementos do PS.

Os níveis de Tfs aqui obtidos foram menores na população urêmica hemodialítica em relação ao grupo controle (tabela 2), conforme estudos anteriores realizados por diferentes pesquisadores em populações não-urêmicas que compararam pacientes com suspeita de sub / infertilidade controles. (Koşar et al. (100), $58,1 \pm 14,4 \mu\text{g} / \text{ml}$ versus $108,4 \pm 17,5 \mu\text{g} / \text{ml}$; Bharshankar e Bharshankar(101) $2,63 \pm 1,76 \text{ mg} / \text{dl}$ vs $5,35 \pm 2,07 \text{ mg} / \text{dl}$ $91 \pm 51 \mu\text{g} / \text{ml}$ e Saeed et al. (102), $54,0 \mu\text{g} / \text{ml}$ (50,0-60, 0) vs $74,0 \mu\text{g} / \text{ml}$ (69,0-80,0).

A diminuição dos níveis médios de Tfs em homens com suspeita de infertilidade e sua correlação com SP observada em diferentes estudos parece ser multifatorial, com participação de fatores genéticos, hormonais, inflamatórios, imunológicos e oxidativos(103).

Por esta razão as alterações seminais nos níveis de Tfs presentes no grupo de paciente estudado podem ser parcialmente justificadas (hipóteses) por alterações importantes nos mecanismos auto regulação autócrino / parácrino de interação entre CG circundantes, CS e CL promovidos por estes fatores conforme proposto por Skinner e Griswold(104).

A ação de citocinas produzidas pela inflamação sistêmica crônica e estresse oxidativo(33) frequentemente observada nestes pacientes têm efeitos variados. As citocinas atuando sobre complexos proteicos denominados elementos sensíveis a íons e proteínas reguladoras de íons (ESIs / PRIs), podem estar envolvidas(33). Estas proteínas são responsáveis pela regulação pós-transcricional das proteínas ligadas à absorção (receptor de transferrina-RTf1), armazenamento (ferritina) e quando alteradas, promovem mudanças nos níveis de íons de ferro intracelulares com efeito tóxico nas células germinativas(33).

A regulação da expressão de RTf1 e síntese de ferritina citosólica depende da intensidade de intermolecular interação do complexo ERIs / PRI modulado pela concentração intracelular de íons de ferro(105).

Níveis de ferro livre intracelular aumentados levando ao aumento da peroxidação lipídica com alterações de esperma morfofuncionais pode explicar parcialmente as alterações seminal observada(106).

Outra evidência da relação da Tfs com PS e fertilidade é encontrada em estudos clínicos de receptores de transferrina solúveis (RTf1-S) por interferem no controle intracelular do íon ferro. Zalat et al. (107) e Bosmans et al. (108) estudaram a associação entre níveis seminal de RTf1-S e níveis de Tfs em amostras de pacientes sub / inférteis com alterações graves e variadas identificadas no espermatozoide. Eles descobriram que os pacientes com alterações de fertilidade diminuíram significativamente ($p < 0,05$) níveis de RTf1-S e Tfs em relação a indivíduos saudáveis e tiveram uma correlação significativa ($p < 0,05$) dos parâmetros RTf1-S e Tfs (motilidade, vitalidade, densidade e morfologia do esperma).

Estes fatores (uremia, inflamação, estresse oxidativo) podem interferir isolados ou associados, direta ou indiretamente no mecanismo complexo da espermatogênese, alterando a síntese, secreção ou função de proteínas reguladoras importantes dos níveis intracelulares de íons ferro (Fts, RTf1)(109). Ou alterando o complexo mecanismo de tolerância imune que confere privilégios imunológicos aos testículos(110) .

5.4 INFLAMAÇÃO SISTÊMICA VERSUS PARÂMETRO SEMINAL, ÍNDICE DE FERTILIDADE, FERRITINA E TRANSFERRINA SEMINAL

A inflamação sistêmica crônica(ISC) é uma característica básica da DRC e é resultado do aumento dos níveis séricos de citocinas pró-inflamatórias, como IL 6, TNF- α e proteína de fase aguda como PCR e fibrinogênio(8), sendo considerada a DRC um estado inflamatório crônico de baixo grau(8).

A ISC e EO afetam 40-60% dos pacientes com DRCH(111) e podem contribuir para alterar os níveis de Fts e Tfs(112, 113).

É aceito que a IS esteja associada ao aumento da síntese e secreção de citocinas pró-inflamatórias intratesticulares por estimulação de macrófagos, CS e CL

resultando em alterações não permanentes no PS (subfertilidade e infertilidade), evidenciadas em modelos animais e estudos em humanos(114).

Há entendimento suficiente que a infecção / inflamação do trato genital promovem a elevação de citocinas no plasma seminal e baixa qualidade de PS conduzindo condição clínica de sub / infertilidade(115).

Estudo experimental em roedores demonstrou que Il-6 secretada pela CS estimula a produção de Fts intratesticulares(116).

Em modelo animal, a indução de IS por injeção de lipopolisacarídeos (LPS) promove elevações não permanentes de citocinas pró-inflamatórias (TNF α , interferon gama [IFN γ], IL-6, IL-12, IL-17 e IL-23) (117). A diminuição dos PS e elevação de marcadores de peroxidação lipídica duraram até 30 dias após a indução inflamatória, retornando aos valores normais posteriormente(117).

Em humanos, Qian et al(118) verificaram a relação entre diferentes citocinas nas amostras de sêmen de 57 pacientes com infertilidade, identificaram uma diminuição do SP e nível significativamente maior de IL-23 neste grupo quando comparada com grupo sadios, respectivamente, 11,14 pg / mL versus e 5,87 pg / mL, $p < 0,001$) e correlações positivas das IL-6, IL-8 e TNF- α com PS.

Kokabet et al(119) verificando se concentrações de IL-6 e IL-8 e números de leucócitos seminal estavam relacionados à infecção por clamídia em população de 255 homens com infertilidade. Verificaram significativos níveis elevados de IL-8, mas não a IL-6, em pacientes com infecção por trachomatis quando comparados com pacientes não infectados e correlação significativa ($p < 0,05$) entre a infecção por trachomatis e motilidade espermática e número de leucócitos seminais.

Os *índices de fertilidades* aqui encontrados foram significativamente menores ($p < 0,001$) nos subgrupos de casos em relação ao grupo controle 0,66 (0,33) (grupo 1) e 1,05 (1,3) (grupo 2) versus 5,54 (1,3) (grupo 3). Este resultado é corroborado por estudo de Xu et al(67) em população urêmica, encontraram resultados semelhantes: 0,68 (2,08) para o caso e 7,7 (13,51) para o controle.

O IF e Tfs são indicadores utilizados desde década de 80 em estudos de pesquisa de pacientes suspeitos de sub / infertilidade com alterações de PS.

Os *níveis de Tfs* significativamente menores ($p < 0,001$) nos subgrupos de caso em relação ao grupo controle $37,90 \pm 06,22$ (grupo 1), $42,35 \pm 09,46$ (grupo 2) versus $73,32 \pm 06,81$ (grupo 3) são corroborados por estudo de Bharshankar e Bharshankarem população não urêmica(101). Estes encontraram concentração

média de Tfs em indivíduos férteis (5,35 mg / dl \pm 2,07) e normozoospermático (4,63 mg / dl \pm 2,50), significativamente maior ($p < 0,001$) em relação a oligozoospermáticos, azoospermia e pós vasectomizados.

As razões para os níveis diferenciados de Tfs nestes grupos de pacientes não são bem claras, mas é hipotetizado que seja devida ação da IL-6 testicular, reduzindo a secreção de transferrina nas células de Sertoli(120).

Outra possível explicação para alterar os níveis de Tfs é ação de citocinas nos compartimentos intratesticulares, causando efeito supressor ou estimulador dependendo do tipo e concentração intratesticular da citocina envolvida, da célula secretora e célula estimulada(121). Sabe-se que a IL-6 induz a síntese de Tfs pelas células de Sertoli e suprime as células germinativas, contribuindo para baixa qualidade seminal encontrada(122).

Esta possível ação da IL-6 foi comprovada no estudo Elhija et al(123). Eles induziram infecção / inflamação sistêmica em roedores por injeção intraperitoneal de lipopolisacarídeos e evidenciaram elevação intratesticular da IL-6 e aumento da síntese de Tfs.

Com relação à Fts poucos estudos revelam seu comportamento frente à inflamação/infecção no trato reprodutivo.

Wan et al(124) investigando associação entre infecção por clamídia trachomatis e os conteúdos de Fts, β -2-microglobulina e proteína total em plasma seminal de 30 homens férteis (grupo normal) e 62 homens inférteis infectados por clamídia trachomatis. Encontraram maiores concentrações das proteínas investigadas no grupo infectado em comparação com controles saudáveis.

Silva et al(125) estudando o efeito da inflamação sistêmica no nível de ferritina seminal em paciente renal crônico submetido a hemodiálise, utilizando metodologia similar, examinou uma amostra de 60 pacientes em HD, não encontraram diferenças significativas ou correlações dos níveis de Fts em pacientes com inflamação, sem inflamação e controles ($p > 0,05$). A dissonância quanto o comportamento dos níveis seminais da ferritina frente à inflamação nos estudos anteriores de Wan e Silva, possivelmente pode ser justificada porque o primeiro foi conduzido em situação clínica aguda ou subaguda de infecção local e o segundo já com mecanismos adaptativos à ISC.

A interação do binômio interativo inflamação/infecção no trato urogenital é aceita como fatores importantes na instalação de quadros clínicos de

sub/infertilidade (126). Esta interação resulta em relação inversa entre o nível de citocinas seminal alterados pela infecção/inflamação do trato genital e qualidade seminal representada por alterações morfofuncional dos espermatozoides e redução da fertilidade associada(120).

Após contribuição reconhecida do fator urêmico na baixa qualidade seminal em pacientes com DRC (66, 67), enfatiza-se as contribuições dos fatores oxidativos / inflamatórios pelas alterações seminais observadas(66, 67).

O paciente hemodialítico EO e ISC que se inter-relacionam, contribuindo enormemente para superprodução de RLs e seus efeitos deletérios sobre CG(12).

Esta ação é atribuída à capacidade dos EROs/RLs de ativarem fatores nucleares, como o fator nuclear kappa beta (FN- $\kappa\beta$), indutor da síntese de citocinas pró-inflamatórias, como a IL-6, TNF α e proteínas de reação de fase aguda, como fibrinogênio e PCR (127).

Além de indutor inflamatório, os RLs têm uma contribuição direta importante nas mudanças de PS, pelos seus efeitos peroxidativos sobre substâncias que compõem a integridade estrutural e funcional dos espermatozoides como proteínas, glicogênio, lipídios e componentes da molécula de DNA(127). Estes efeitos isolados ou combinados podem justificar em parte as alterações morfofuncionais das células reprodutivas encontradas no caso sub / infertilidade masculina(12).

Não é incomum associação entre ISC e diferentes estados de DRC/HD(8). A hipercitokinemia gerada no paciente em HD pode afetar profundamente a permeabilidade vascular testicular e alcançar o compartimento intersticial e epitelial dos túbulos seminíferos , promovendo alterações importantes nas células reprodutivas(128).

A hipercitokinemia do processo inflamatório crônico nos pacientes HD altera complexas interações moduladoras entre mediadores imunológicos, oxidativos e inflamatórios responsáveis pela manutenção em equilíbrio do micro ambiente do epitélio seminífero, podendo levar a disfunções espermáticas observadas(120).

Isso causaria mudanças profundas na fisiologia da BHT (alteração de permeabilidade), deixando ultrapassar citocinas e outras substâncias sinalizadoras de macrófagos testiculares a produzirem diferentes citoquinas pró e anti-inflamatórias(129), destruição/desregulação dos sistemas locais parácrino / autócrino(31) e outros mecanismos responsáveis pela manutenção da condição testicular imunoprivilegiada(95).

Assim, não podemos afirmar que as diferenças significativas encontradas nos PS entre caso e grupo controle ($p < 0,001$); nem o impacto do fator inflamatório não evidenciado nos subgrupos de casos (grupos 1 e 2) sobre IF, perfil hormonal e Tfs ($p > 0,05$) (Tabela 2) sejam atribuídas unicamente ao fator inflamatório sistêmico.

A ausência de correlação do fator inflamatório com IF e Tfs (Tabela 4) reforça a hipótese da etiologia multifatorial das alterações seminais evidenciadas nestes pacientes.

Em relação a este subtema, nossos estudos sugerem que o fator inflamatório analisado isoladamente não tem impacto e não está associado ao índice de fertilidade ou nível Tfs em paciente HD em investigação de sub/infertilidade masculina.

5.5 PARÂMETROS HORMONAIS VERSUS PARÂMETRO SEMINAL, FERRITINA E TRANSFERRINA SEMINAIS

À medida que a DRC avança, desencadeiam-se respostas fisiológicas que perturbam atividades de outros órgãos e sistemas(88), principalmente no sistema endócrino, sendo mais evidente no estágio 5 ou hemodialítico)(88).

A redução na função renal pode afetar os níveis hormonais de várias maneiras(130):

- Alteração na metabolização ou excreção dos hormônios pelos rins;
- Mecanismos de *feedback* sensíveis são desestabilizados pela DRC; e
- Alteração na concentração dos níveis séricos de proteínas de transporte pela disfunção renal existente.

A hiperprolactinemia e o hipogonadismo são distúrbios endócrinos significativos que ocorrem na configuração em estágios finais da DRC(5).

Os hormônios hipotalâmicos(FSH e LH) e principalmente a TT regulam a síntese de Fts e Tfs pelas CS e testosterona nas CL a nível testicular por mecanismos de *feedback* testicular e hipofisários(131).

Assim, alteração do perfil hormonal sérico pode, em tese, interferir direta ou indiretamente na qualidade do PS e níveis de Fts e Tfs seminais.

O Tabela 7 abaixo mostra o parâmetro hormonal de pacientes RCHD em relação à população não urêmica evidenciados em estudos mais recentes. Mesmo sem considerar a possível influência do fator inflamatório nestes estudos clínicos, percebe-se, a exceção dos nível sérico médio do FSH que foi normal no estudo Eckersten e dos níveis de TT aqui encontrados dentro dos limites de normalidades, nossos resultados seguem o padrão comumente observado em pacientes portadores de DRC em estágio terminal, ou seja: níveis elevados de FSH, LH, PRL e baixa testosterona (hipogonadismo)(131).

Tabela 7 - Parâmetros hormonais de hemodialíticos crônicos versus pacientes saudáveis evidenciados no estudo atual e anteriores

Estudos	Parâmetros hormonais			
	FSH	LH	Testosterona	Prolactina
	VR=0,7 - 11,1	VR=0,8 - 7,6	VR= 241 - 827	VR= 2.1 – 19,0
<u>Atual</u> (2016)	06,30± 01,21 n	15,91± 02,62 ↑	411,03± 58,88 n	16,38± 02,92 n
Lehtihet(66) (2015)	14.95±6.99 ↑ p>0,05	18.32 ± 9.50 ↑ p<0,05	92,6±10,2 ↓ p<0,05	19.03±2.13 ↑ p<0,05
Eckersten(132) (2015)	4.52±2.46 n p>0,05	8.87±8.57 ↑ p<0,05	125,0±51,7 ↓ p>0,05	89.7±22.9 ↑ p<0,05
Zedan(49) (2013)	9.8±6.8 ↑ p>0,05	15.9±35.6 ↑ p>0,05	119.5±9.9 ↓ p<0,05	33.3±44.4 (↑) p<0,05
Long-Gen(68) (2009)	14.93 ± 3.04 ↑ p<0,05	14.53 ± 2.70 ↑ p<0,05	166.68 ± 46.66 ↓ p<0,05	29.23 ± 11.36 ↑ p<0,05

FSH- hormônio foliculo estimulante em mUI/ml; LH- hormônio luteinizante em mUI/ml; ↑- elevado; ↓diminuído; VR-valor de referência; n=normal

Na DRCH, a secreção pituitária de LH mantém seu caráter pulsátil(cíclico), mas a amplitude dos pulsos é diminuída (5). Os níveis basais de LH são elevados, devido em parte ao feedback de baixos níveis de testosterona e, em parte, à redução da depuração renal(5). Além dessas mudanças secretoras, a sinalização normal do hormônio luteinizante é inibida na DRC(133). O grau de desregulação endócrina dos doentes DRCH é proporcional à redução da taxa de filtração glomerular (GFR) (133).

A deficiência de testosterona (ou hipogonadismo) é outra condição frequente em pacientes com DRC, particularmente naqueles que recebem diálise(134).

No presente estudo a amostra eugonádica de conveniência de doentes renais crônicos hemodialíticos a princípio afasta viés de hipogonadismo clínico com interferência na avaliação dos níveis seminais das proteínas estudadas (Fts e Tfs) e PS sensíveis às variações dos níveis de testosterona sérica. Por outro lado, não afasta integralmente casos *borderlines* ou subclínicos talvez presentes na amostra estudada(135).Estudos sugerem que 40-60% dos pacientes com hemodiálise exibam hipogonadismo(6, 134) e cerca de 15-40% acometem aqueles com DRC em estágios 1-4(136).

Esta prevalência hipogonadismo clínico neste grupo de pacientes são notavelmente superior à taxa geral da população(134).

Contribuem na etiologia do hipogonadismo masculino a insuficiente estimulação das gonadotropinas hipofisárias, decréscimo de produção de testosterona com a idade e aumento plasmático da globulina transportadora de hormônio sexual(GTHS)(134).

Com o aumento da longevidade população dialítica também contribui, em parte, para redução dos níveis de testosterona(hipogonadismo) e exacerba os efeitos evolutivos da DRC(137).

O hipogonadismo central(distúrbios de liberação e secreção das gonadotrofinas)(138), resposta embotada a nível das CL a estímulos do LH hipofisário(139), reduzido tamanho testicular(77) associado a anormalidades histológicas identificáveis a nível dos tubular seminífero como fibrose intersticial e áreas de calcificação, concorrem fortemente para hipótese de falência testicular(hipogonadismo primário) nos portadores de DRC(136).

A hiperprolactinemia é outra alteração endocrinológica presente em DRC, principalmente naqueles que recebem diálise, com prevalência não desprezível de

30-65%(140). Admite-se que este excesso de PRL é devido a uma combinação de diminuição do *clearance* renal e aumento da síntese de PRL hipofisária promovidas pelas alterações neuroendócrinas presentes no DRCH(140).

O presente estudo apresenta as seguintes limitações que devem ser consideradas na análise e interpretação dos resultados aqui obtidos: amostra reduzida; utilização da PCR sérica como marcador inflamatório inespecífico e ausência de mensuração da capacidade total antioxidativa do plasma seminal.

6 CONCLUSÕES

- ✓ A inflamação sistêmica definida pelo nível sérico da proteína c reativa analisada isoladamente parece não afetar significativamente os níveis de ferritina/transferrina seminal. Mas a transferrina seminal parece estar associada positivamente com parâmetros seminais e índice de fertilidade, sugerindo possível efeito protetor sobre qualidade seminal, podendo ser útil na avaliação inicial de paciente renal crônico em hemodiálise com suspeita clínica de sub/infertilidade por alteração na qualidade seminal;
- ✓ A concentração média (ng/ml) de ferritina e transferrina seminal em homem adulto renal crônico hemodialítico com e sem inflamação foram, respectivamente:
 - ✓ 215,47±47,77; 237,68±52,49 versus 37,90 ±06,22; 42,35±09,46;
- ✓ Os parâmetros avaliados nos pacientes renais crônicos hemodialíticos foram significativamente menores em relação ao grupo controle, excetuando-se a globulina (parâmetro bioquímico) e a ferritina seminal que foram similares;
- ✓ A inflamação sistêmica definida pelos níveis séricos de PCR analisada isoladamente parece não interferir significativamente nos parâmetros (bioquímicos, seminal, hormonal), índice de fertilidade e níveis seminais de ferritina e transferrina) em homem adulto renal crônico hemodialítico. Mas estes parâmetros foram significativamente menores no grupo caso em relação ao grupo controle, sugerindo contribuição de outros fatores para estas diferenças;
- ✓ A PCR sérica não está associada à ferritina e transferrina seminal, índice de fertilidade, parâmetros seminais ou perfil hormonal; e
- ✓ Transferrina seminal parece estar associada ao índice de fertilidade e parâmetros seminais.

REFERÊNCIAS

1. Sartorius GA, Handelsman DJ. Testicular dysfunction in systemic diseases. *Andrology*: Springer; 2010. p. 339-64.
2. Dusenbury W, Palm Johansen P, Mosack V, Steinke EE. Determinants of sexual function and dysfunction in men and women with stroke: A systematic review. *Int J Clin Pract*. 2017;71(7).
3. Karagiannis A, Harsoulis F. Gonadal dysfunction in systemic diseases. *Eur J Endocrinol*. 2005;152(4):501-13.
4. Kalyani RR, Gavini S, Dobs AS. Male hypogonadism in systemic disease. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2007;36(2):333-48.
5. Onder S, Akbar S, Schmidt RJ. Reproductive Endocrinology in Chronic Kidney Disease Patients: New Approaches to Old Challenges. *Semin Dial*. 2016.
6. Kuczera P, Adamczak M, Wiecek A. Endocrine Abnormalities in Patients with Chronic Kidney Disease. *Pril (Makedon Akad Nauk Umet Odd Med Nauki)*. 2015;36(2):109-18.
7. Tucker PS, Scanlan AT, Dalbo VJ. Chronic kidney disease influences multiple systems: describing the relationship between oxidative stress, inflammation, kidney damage, and concomitant disease.
8. Akchurin OM, Kaskel F. Update on inflammation in chronic kidney disease. *Blood Purif*. 2015;39(1-3):84-92.
9. Pedruzzi LM, Cardozo LFMF, Daleprane JB, Stockler-Pinto MB, Monteiro EB, Leite MJ, et al. Systemic inflammation and oxidative stress in hemodialysis patients are associated with down-regulation of Nrf2. *Journal of nephrology*. 2015;28(4):495-501.
10. Amoako AA, Marczylo TH, Marczylo EL, Elson J, Willets JM, Taylor AH, et al. Anandamide modulates human sperm motility: implications for men with asthenozoospermia and oligoasthenoteratozoospermia. *Hum Reprod*. 2013;28(8):2058-66.
11. Cai LY, Kato T, Chen M, Wang H, Sekine E, Izumi S, et al. Accumulated HSV1-TK proteins interfere with spermatogenesis through a disruption of the integrity of Sertoli-germ cell junctions. *J Reprod Dev*. 2012;58(5):544-51.
12. Hagmann H, Brinkkoetter PT. ROS and oxidative stress in CKD patients: is it the mitochondria that keeps CKD patients in bed? *Nephrol Dial Transplant*. 2015;30(6):867-8.
13. Sanchez A, Calpena AC, Clares B. Evaluating the Oxidative Stress in Inflammation: Role of Melatonin. *International journal of molecular sciences*. 2015;16(8):16981-7004.
14. Vianna HR, Soares CM, Tavares MS, Teixeira MM, Silva AC. [Inflammation in chronic kidney disease: the role of cytokines]. *J Bras Nefrol*. 2011;33(3):351-64.
15. Ventimiglia E, Montorsi F, Salonia A. Comorbidities and male infertility: a worrisome picture. *Curr Opin Urol*. 2016;26(2):146-51.
16. Zhang HY, Lu JC, Feng RX. [Correlations of 24 biochemical markers in seminal plasma with routine semen parameters]. *Zhonghua Nan Ke Xue*. 2015;21(12):1087-92.
17. Bieniek JM, Drabovich AP, Lo KC. Seminal biomarkers for the evaluation of male infertility. *Asian J Androl*. 2016;18(3):426-33.
18. Lee BT, Ahmed FA, Hamm LL, Teran FJ, Chen CS, Liu Y, et al. Association of C-reactive protein, tumor necrosis factor-alpha, and interleukin-6 with chronic kidney disease. *BMC Nephrol*. 2015;16:77.
19. Liu DY, Cooper EJ, Baker HW. Seminal transferrin, an index of Sertoli cell function: is it of clinical value? *Clin Reprod Fertil*. 1986;4(3):191-7.
20. Barthelemy C, Khalfoun B, Guillaumin JM, Lecomte P, Bardos P. Seminal fluid transferrin as an index of gonadal function in men. *J Reprod Fertil*. 1988;82(1):113-8.

21. Weinbauer GF, Luetjens CM, Simoni M, Nieschlag E. Physiology of testicular function. *Andrology*: Springer; 2010. p. 11-59.
22. Franca LR, Hess RA, Dufour JM, Hofmann MC, Griswold MD. The Sertoli cell: one hundred fifty years of beauty and plasticity. *Andrology*. 2016;4(2):189-212.
23. Ilacqua A, Francomano D, Aversa A. *The Physiology of the Testis. Principles of Endocrinology and Hormone Action*: Springer; 2016. p. 1-38.
24. Cheng CY, Wong EW, Yan HH, Mruk DD. Regulation of spermatogenesis in the microenvironment of the seminiferous epithelium: new insights and advances. *Mol Cell Endocrinol*. 2010;315(1-2):49-56.
25. Hales DB, Diemer T, Hales KH. Role of cytokines in testicular function. *Endocrine*. 1999;10(3):201-17.
26. Guazzone VA, Jacobo P, Theas MS, Lustig L. Cytokines and chemokines in testicular inflammation: A brief review. *Microsc Res Tech*. 2009;72(8):620-8.
27. Chen H, Mruk D, Xiao X, Cheng CY. *Human Spermatogenesis and Its Regulation. Male Hypogonadism*: Springer; 2017. p. 49-72.
28. Bornstein SR, Rutkowski H, Vrezas I. Cytokines and steroidogenesis. *Mol Cell Endocrinol*. 2004;215(1-2):135-41.
29. Ramaswamy S, Weinbauer GF. Endocrine control of spermatogenesis: Role of FSH and LH/ testosterone. *Spermatogenesis*. 2014;4(2):e996025.
30. Cheng CY, Mruk DD. A local autocrine axis in the testes that regulates spermatogenesis. *Nature reviews Endocrinology*. 2010;6(7):380-95.
31. Huleihel M, Lunenfeld E. Regulation of spermatogenesis by paracrine/autocrine testicular factors. *Asian J Androl*. 2004;6(3):259-68.
32. Tang EI, Mruk DD, Lee WM, Cheng CY. Cell–cell interactions, cell polarity, and the blood–testis barrier. *Cell Polarity 1*: Springer; 2015. p. 303-26.
33. Kuhn LC. Iron regulatory proteins and their role in controlling iron metabolism. *Metallomics : integrated biometal science*. 2015;7(2):232-43.
34. Leichtmann-Bardoogo Y, Cohen LA, Weiss A, Marohn B, Schubert S, Meinhardt A, et al. Compartmentalization and regulation of iron metabolism proteins protect male germ cells from iron overload. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism*. 2012;302(12):E1519-30.
35. Sylvester SR, Griswold MD. The testicular iron shuttle: a "nurse" function of the Sertoli cells. *J Androl*. 1994;15(5):381-5.
36. Arosio P, Carmona F, Gozzelino R, Maccarinelli F, Poli M. The importance of eukaryotic ferritins in iron handling and cytoprotection. *Biochem J*. 2015;472(1):1-15.
37. Wise T, Lunstra DD, Rohrer GA, Ford JJ. Relationships of testicular iron and ferritin concentrations with testicular weight and sperm production in boars. *J Anim Sci*. 2003;81(2):503-11.
38. Koeva YA. Immunoreactivity for ferritin in Leydig cells of human testis. *Folia Med (Plovdiv)*. 2002;44(3):24-6.
39. Skinner MK. Sertoli cell secreted regulatory factors. *Sertoli Cell Biology*. 2005:107-20.
40. Mittler R. ROS Are Good. *Trends Plant Sci*. 2017;22(1):11-9.
41. Méndez I, Vázquez-Martínez O, Hernández-Muñoz R, Valente-Godínez H, Díaz-Muñoz M. Redox regulation and pro-oxidant reactions in the physiology of circadian systems. *Biochimie*. 2016;124:178-86.
42. Micheli L, Cerretani D, Collodel G, Menchiari A, Moltoni L, Fiaschi A, et al. Evaluation of enzymatic and non-enzymatic antioxidants in seminal plasma of men with genitourinary infections, varicocele and idiopathic infertility. *Andrology*. 2016;4(3):456-64.

43. Bartosz G. Non-enzymatic antioxidant capacity assays: Limitations of use in biomedicine. *Free Radic Res.* 2010;44(7):711-20.
44. Sabeti P, Pourmasumi S, Rahiminia T, Akyash F, Talebi AR. Etiologies of sperm oxidative stress. *International journal of reproductive biomedicine (Yazd, Iran).* 2016;14(4):231-40.
45. KDOQI, Foundation NK. KDOQI Clinical Practice Guidelines and Clinical Practice Recommendations for Anemia in Chronic Kidney Disease. *Am J Kidney Dis.* 2006;47(5 Suppl 3):S11-145.
46. Willerson JT, Ridker PM. Inflammation as a cardiovascular risk factor. *Circulation.* 2004;109(21 Suppl 1):II2-10.
47. World Health O. WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen 2010. 271 p.
48. Harvey C. A fertility index derived from semen analysis. *J Clin Pathol.* 1953;6(3):232-6.
49. Zedan H, Kamal EE, El Shazly A, El Rahman MZA, Shawky A. Impact of renal failure and haemodialysis on semen parameters and reproductive hormones. *Human Andrology.* 2013;3(1):16-20.
50. Prem AR, Puneekar SV, Kalpana M, Kelkar AR, Acharya VN. Male reproductive function in uraemia: efficacy of haemodialysis and renal transplantation. *British journal of urology.* 1996;78(4):635-8.
51. Delles C, Vanholder R. Chronic kidney disease. *Clin Sci (Lond).* 2017;131(3):225-6.
52. Wang DG, Hong HO, Ren W, Huang ZZ, Ni LJ, Hu SL. [Effects of aging and decreased glomerular filtration rate on the prevalence of anemia in elderly population receiving body check from urban area of Hefei, China.]. *Zhonghua nei ke za zhi.* 2010;49(1):28-31.
53. Ryu SR, Park SK, Jung JY, Kim YH, Oh YK, Yoo TH, et al. The Prevalence and Management of Anemia in Chronic Kidney Disease Patients: Result from the KoreaN Cohort Study for Outcomes in Patients With Chronic Kidney Disease (KNOW-CKD). *J Korean Med Sci.* 2017;32(2):249-56.
54. Sesso RC, Lopes AA, Thome FS, Lugon JR, Watanabe Y, dos Santos DR. [Report of the Brazilian Chronic Dialysis Census 2012]. *J Bras Nefrol.* 2014;36(1):48-53.
55. Daugirdas JT. Iron and anemia in chronic kidney disease: New treatments changing old paradigms. *Hemodial Int.* 2017;21 Suppl 1:S3-S5.
56. Smirnov OA. [Anemia during inflammatory processes: pathogenesis and clinical and morphological manifestations]. *Arkhiv patologii.* 2010;72(2):56-61.
57. Sany D, Elsayy AE, Elshahawy Y. Heparin and regulation of iron homeostasis in maintenance hemodialysis patients. *Saudi J Kidney Dis Transpl.* 2014;25(5):967-73.
58. Reichert CO, da Cunha J, Levy D, Maselli LMF, Bydlowski SP, Spada C. Heparin: Homeostasis and Diseases Related to Iron Metabolism. *Acta haematologica.* 2017;137(4):220-36.
59. Ganz T, Nemeth E. HEPARIN AND IRON HOMEOSTASIS. *Biochim Biophys Acta.* 2012;1823(9):1434-43.
60. Fraenkel PG. Anemia of Inflammation: A Review. *Med Clin North Am.* 2017;101(2):285-96.
61. Miettinen J, Tainio J, Jahnukainen T, Pakarinen M, Lauronen J, Jalanko H. Anemia and low-grade inflammation in pediatric kidney transplant recipients. *Pediatr Nephrol.* 2017;32(2):347-58.
62. van Gelder MK, Abrahams AC, Joles JA, Kaysen GA, Gerritsen KG. Albumin handling in different hemodialysis modalities. *Nephrology Dialysis Transplantation.* 2017.

63. Eisenberg ML, Meldrum D. Effects of age on fertility and sexual function. *Fertility and sterility*. 2017;107(2):301-4.
64. Kerschbaum HH, Hofbauer I, Gföllner A, Ebner B, Bresgen N, Bäuml KHT. Sex, age, and sex hormones affect recall of words in a directed forgetting paradigm. *Journal of neuroscience research*. 2017;95(1-2):251-9.
65. Ohnaka K. Aging and homeostasis. Sex hormones and aging. *Clinical calcium*. 2017;27(7):947.
66. Lehtihet M, Hylander B. Semen quality in men with chronic kidney disease and its correlation with chronic kidney disease stages. *Andrologia*. 2015;47(10):1103-8.
67. Xu L, Xu H, Zhu X, Zhang J, Ma M, Shi X. Effect of uremia on semen quality and reproductive function in humans. *Cell Biochem Biophys*. 2012;62(1):29-33.
68. Xu LG, Xu HM, Zhu XF, Jin LM, Xu B, Wu Y, et al. Examination of the semen quality of patients with uraemia and renal transplant recipients in comparison with a control group. *Andrologia*. 2009;41(4):235-40.
69. Xu L, Xu H, Song Q, Qi X, Wang X, Zhang J, et al. [Changes of semen quality in uremia patients]. *Zhonghua Nan Ke Xue*. 2004;10(9):673-5.
70. Santos JTCd. *Fertilidade masculina e envelhecimento 2015*.
71. Handelsman DJ. Testosterone and Male Aging: Faltering Hope for Rejuvenation. *Jama*. 2017;317(7):699-701.
72. Padro CJ, Sanders VM. Neuroendocrine regulation of inflammation. *Semin Immunol*. 2014;26(5):357-68.
73. Verburg-van Kemenade BM, Cohen N, Chadzinska M. Neuroendocrine-immune interaction: Evolutionarily conserved mechanisms that maintain allostasis in an ever-changing environment. *Dev Comp Immunol*. 2017;66:2-23.
74. Oliveira JBA, Petersen CG, Mauri AL, Vagnini LD, Baruffi RL, Franco Jr JG. The effects of age on sperm quality: an evaluation of 1,500 semen samples. *JBRA Assist Reprod*. 2014;18:34-41.
75. Mitchell UA, Aneshensel CS. Social Inequalities in Inflammation: Age Variations in Older Persons. *Journal of aging and health*. 2017;29(5):769-87.
76. Xia S, Zhang X, Zheng S, Khanabdali R, Kalionis B, Wu J, et al. An Update on Inflamm-Aging: Mechanisms, Prevention, and Treatment. *J Immunol Res*. 2016;2016:8426874.
77. Pawelec G, Goldeck D, Derhovanessian E. Inflammation, ageing and chronic disease. *Current opinion in immunology*. 2014;29:23-8.
78. Neto FTL, Bach PV, Najari BB, Li PS, Goldstein M. Spermatogenesis in humans and its affecting factors. *Semin Cell Dev Biol*. 2016;59:10-26.
79. Watt RK. The many faces of the octahedral ferritin protein. *Biometals*. 2011;24(3):489-500.
80. Griswold MD. *Sertoli Cell Biology*: Academic Press; 2014 2014/11/19. 488 p.
81. Silva B, Faustino P. An overview of molecular basis of iron metabolism regulation and the associated pathologies. *Biochim Biophys Acta*. 2015;1852(7):1347-59.
82. Arosio P, Elia L, Poli M. Ferritin, cellular iron storage and regulation. *IUBMB Life*. 2017;69(6):414-22.
83. Kwenang A, Kroos MJ, Koster JF, van Eijk HG. Iron, ferritin and copper in seminal plasma. *Hum Reprod*. 1987;2(5):387-8.
84. Ferreira J, Pio C, Lima ES. A dosagem da ferritina no plasma seminal pode ser um marcador do estresse oxidativo no sêmen. *News Lab*. 2009.
85. Bacterial LPS Mediated Acute Inflammation-induced Spermatogenic Failure in Rats: Role of Stress Response Proteins and Mitochondrial Dysfunction | SpringerLink. 2017.

86. Neto FT, Bach PV, Najari BB, Li PS, Goldstein M. Spermatogenesis in humans and its affecting factors. *Semin Cell Dev Biol.* 2016;59:10-26.
87. Aitken RJ, Smith TB, Jobling MS, Baker MA, De Iuliis GN. Oxidative stress and male reproductive health. *Asian J Androl.* 2014;16(1):31-8.
88. Neuzillet Y, Thuret R, Kleinclauss F, Timsit MO. [Andrologic consequences of chronic renal failure: State of the art for the yearly scientific report of the French National Association of Urology]. *Prog Urol.* 2016;26(15):1088-93.
89. Tremblay JJ. Molecular regulation of steroidogenesis in endocrine Leydig cells. *Steroids.* 2015;103:3-10.
90. Xu LG, Shi SF, Qi XP, Huang XF, Xu HM, Song QZ, et al. Morphological characteristics of spermatozoa before and after renal transplantation. *Asian J Androl.* 2005;7(1):81-5.
91. Schieber M, Chandel NS. ROS function in redox signaling and oxidative stress. *Curr Biol.* 2014;24(10):R453-62.
92. Aitken RJ. Oxidative stress and the etiology of male infertility. *J Assist Reprod Genet.* Netherlands 2016.
93. Agarwal A, Virk G, Ong C, du Plessis SS. Effect of oxidative stress on male reproduction. *World J Mens Health.* 2014;32(1):1-17.
94. Xu L, Xu H, Zhu X, Zhang J, Ma M, Shi X. Effect of uremia on semen quality and reproductive function in humans. *Cell Biochem Biophys.* 2012;62(1):29-33.
95. Fijak M, Bhushan S, Meinhardt A. The Immune Privilege of the Testis. *Immune Infertility: Springer;* 2017. p. 97-107.
96. Chen Q, Deng T, Han D. Testicular immunoregulation and spermatogenesis. *Semin Cell Dev Biol.* 2016;59:157-65.
97. Zhang D-L, Ghosh MC, Rouault TA. The physiological functions of iron regulatory proteins in iron homeostasis - an update. *Front Pharmacol.* 2014;5.
98. Meinhardt A, Hedger MP. Immunological, paracrine and endocrine aspects of testicular immune privilege. *Mol Cell Endocrinol.* 2011;335(1):60-8.
99. Gkouvatsos K, Papanikolaou G, Pantopoulos K. Regulation of iron transport and the role of transferrin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects.* 2012;1820(3):188-202.
100. Koşar A, Sarica K, Ozdiler E. Effect of varicocele on seminal plasma transferrin values: a comparative clinical trial. *Andrologia.* 2000;32(1):19-22.
101. Bharshankar RN, Bharshankar JR. Relationship of seminal plasma transferrin with seminal parameters in male infertility. *Indian J Physiol Pharmacol.* 2000;44(4):456-60.
102. Saeed S, Khan FA, Rahman SB, Khan DA, Ahmad M. Biochemical parameters in evaluation of oligospermia. *J Pak Med Assoc.* 1994;44(6):137-40.
103. Dohle G. Male Factors in Couple's Infertility. *Clinical Uro-Andrology: Springer;* 2015. p. 197-201.
104. Griswold MD. Sertoli cell biology: Academic Press; 2014.
105. Zhang DL, Ghosh MC, Rouault TA. The physiological functions of iron regulatory proteins in iron homeostasis - an update. *Frontiers in pharmacology.* 2014;5:124.
106. Abbaspour N, Hurrell R, Kelishadi R. Review on iron and its importance for human health. *J Res Med Sci.* 2014;19(2):164-74.
107. Zalata A, Hafez T, Schoonjans F, Comhaire F. The possible meaning of transferrin and its soluble receptors in seminal plasma as markers of the seminiferous epithelium. *Hum Reprod.* 1996;11(4):761-4.
108. Bosmans E, Berghmans R, Kenis G, Cox A, Janssen M, Pollet H, et al. R-015. Transferrin and soluble transferrin receptor in seminal fluid as markers for fertility. *Hum Reprod.* 1999;14(Suppl_3):285-.

109. Anderson CP, Shen L, Eisenstein RS, Leibold EA. Mammalian iron metabolism and its control by iron regulatory proteins☆. *Biochim Biophys Acta*. 2012;1823(9):1468-83.
110. Chen Q, Deng T, Han D. Testicular immunoregulation and spermatogenesis. *Semin Cell Dev Biol*. 2016;59:157-65.
111. Maeda Y, Inoguchi T. [Oxidative stress and chronic inflammation]. *Nihon rinsho Japanese journal of clinical medicine*. 2016;74 Suppl 2:73-6.
112. Bou-Abdallah F. Transferrins: Molecular mechanisms of iron transport and disorders. 2012. p. 157-8.
113. Kwon W-S, Rahman MS, Kim Y-J, Ryu D-Y, Kahtun A, Pang M-G. Ferritin Overload Suppresses Male Fertility Via altered Acrosome Reaction. *Reproductive & developmental biology*. 2015;39(4):117-25.
114. Fraczek M, Kurpisz M. Cytokines in the male reproductive tract and their role in infertility disorders. *J Reprod Immunol*. 2015;108:98-104.
115. Haidl F, Haidl G, Oltermann I, Allam JP. Seminal parameters of chronic male genital inflammation are associated with disturbed sperm DNA integrity. *Andrologia*. 2015;47(4):464-9.
116. Elhija MA, Potashnik H, Lunenfeld E, Potashnik G, Schlatt S, Nieschlag E, et al. Testicular interleukin-6 response to systemic inflammation. *European cytokine network*. 2005;16(2):167-72.
117. Collodel G, Moretti E, Brecchia G, Kuželová L, Arruda J, Mourvaki E, et al. Cytokines release and oxidative status in semen samples from rabbits treated with bacterial lipopolysaccharide. *Theriogenology*. 2015;83(7):1233-40.
118. Qian L, Sun G, Zhou B, Wang G, Song J, He H. Study on the relationship between different cytokines in the semen of infertility patients. *Am J Reprod Immunol*. 2011;66(2):157-61.
119. Kokab A, Akhondi MM, Sadeghi MR, Modarresi MH, Aarabi M, Jennings R, et al. Raised inflammatory markers in semen from men with asymptomatic chlamydial infection. *J Androl*. 2010;31(2):114-20.
120. Fraczek M, Kurpisz M. Cytokines in the male reproductive tract and their role in infertility disorders. *J Reprod Immunol*. 2015;108:98-104.
121. Cytokines in the male reproductive tract and their role in infertility disorders - *Journal of Reproductive Immunology* 2016 [Available from: [http://www.jrijournal.org/article/S0165-0378\(15\)00031-5/abstract](http://www.jrijournal.org/article/S0165-0378(15)00031-5/abstract)].
122. Salman DTA-WD. Evaluation the Effect of Interleukin-6 and Tumor Necrosis Factor in Semen Quality of Infertile Men with Varicocele. *Kufa Journal for Nursing Sciences* | تلجم 6;2016 .(ةبضبرمبلا مول عمل فتوكلا) 2.
123. Elhija MA, Potashnik H, Lunenfeld E, Potashnik G, Schlatt S, Nieschlag E, et al. Testicular interleukin-6 response to systemic inflammation. *Eur Cytokine Netw*. 2005;16(2):167-72.
124. Wan Changchun WZHAOBRC. The relation between chlamydia trachomatis infection and the contents of seminal plasma ferritin, β_2 -Microglobulin and total protein-- 《Chinese Journal of Andrology》 2003年01期. *Chinese Journal of Andrology*. 2003;1(1):37-8.
125. Silva GP, De La Vega Elena CD, Carneiro FP, Veiga JPR. Effect of systemic inflammation on level of ferritin seminal in chronic renal male patient undergoing hemodialysis. *Int Arch Med*. 2014;7:23.
126. Mayer C, Adam M, Glashauser L, Dietrich K, Schwarzer JU, Köhn FM, et al. Sterile inflammation as a factor in human male infertility: Involvement of Toll like receptor 2, biglycan and peritubular cells. *Scientific reports*. 2016;6:37128.

127. Tucker PS, Scanlan AT, Dalbo VJ. Chronic kidney disease influences multiple systems: describing the relationship between oxidative stress, inflammation, kidney damage, and concomitant disease. *Oxid Med Cell Longev*. 2015;2015:806358.
128. Zhang H, Yin Y, Wang G, Liu Z, Liu L, Sun F. Interleukin-6 disrupts blood-testis barrier through inhibiting protein degradation or activating phosphorylated ERK in Sertoli cells. *Scientific reports*. 2014;4:4260.
129. Mruk DD, Cheng CY. The Mammalian Blood-Testis Barrier: Its Biology and Regulation. *Endocr Rev*. 2015;36(5):564-91.
130. Gungor O, Kocyigit I, Carrero JJ, Yılmaz MI, editors. Hormonal changes in hemodialysis patients: Novel risk factors for mortality? *Seminars in Dialysis*; 2017: Wiley Online Library.
131. Palmer BF, Clegg DJ. Gonadal dysfunction in chronic kidney disease. *Rev Endocr Metab Disord*. 2016.
132. Eckersten D, Giwercman A, Christensson A. Male patients with terminal renal failure exhibit low serum levels of antimüllerian hormone. *Asian J Androl*. 2015;17(1):149-53.
133. Meuwese CL, Carrero JJ. Chronic kidney disease and hypothalamic-pituitary axis dysfunction: the chicken or the egg? *Arch Med Res*. 2013;44(8):591-600.
134. Thirumavalavan N, Wilken NA, Ramasamy R. Hypogonadism and renal failure: An update. *Indian J Urol*. 2015;31(2):89-93.
135. Singh AB, Norris K, Modi N, Sinha-Hikim I, Shen R, Davidson T, et al. Pharmacokinetics of a transdermal testosterone system in men with end stage renal disease receiving maintenance hemodialysis and healthy hypogonadal men. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001;86(6):2437-45.
136. Albaaj F, Sivalingham M, Haynes P, McKinnon G, Foley RN, Waldek S, et al. Prevalence of hypogonadism in male patients with renal failure. *Postgrad Med J*. 2006;82(972):693-6.
137. Martínez-Jabaloyas JM, Queipo-Zaragoza A, Ferrandis-Cortes C, Queipo-Zaragoza JA, Gil-Salom M, Chuan-Nuez P. [Relationships between sex hormone levels in men over 50 years of age and body composition, bone quality, and quality of life]. *Actas Urol Esp*. 2011;35(9):515-22.
138. Snyder G, Shoskes DA. Hypogonadism and testosterone replacement therapy in end-stage renal disease (ESRD) and transplant patients. *Transl Androl Urol*. 2016;5(6):885-9.
139. Gray PB, McHale TS, Carré JM. A review of human male field studies of hormones and behavioral reproductive effort. *Hormones and behavior*. 2017;91:52-67.
140. Lo JC, Beck GJ, Kaysen GA, Chan CT, Kliger AS, Rocco MV, et al. Hyperprolactinemia in end-stage renal disease and effects of frequent hemodialysis. *Hemodial Int*. 2017;21(2):190-6.

ANEXO A - ESPERMOGRAMA MÉTODO MANUAL (OMS 5ª Ed., 2010)

A-Exame Macroscópico

A.1 liquefação

Processo enzimático promovido principalmente pela enzima antígeno prostático específico (PSA). A amostra seminal foi deixada à temperatura ambiente (37 °C) por 30 minutos até liquefação completa;

A.2 Viscosidade

Foi avaliada após a liquefação, com o auxílio de uma pipeta sorológica de 5 ml. A viscosidade é considerada quando o fluido seminal liquefeito sai da pipeta por ação somente da força da gravidade, goteja ou forma um filamento com extensão inferior a 2 cm;

A.3 Aspecto

É modificado à medida que os processos de coagulação e liquefação acontecem. Imediatamente após a coleta, a amostra seminal tem aspecto heterogêneo, espesso e gelatinoso, tornando-se opalescente, homogêneo e mais fluido após a liquefação;

A.5 pH seminal

É resultado da mistura das secreções das vesículas seminais (pH alcalino) e da próstata (pH ácido). Foi determinado por papel de indicador de pH. Valor normal no seminal é $\geq 7,2$;

A.5 Volume

Com auxílio de uma pipeta sorológica graduada de 5 ml, com intervalo de 0,1 ml, mede-se o volume, aspirando-se toda amostra colhida após a liquefação.

B- Exame Microscópico

B.1 Agregação e aglutinação

20 µL do sêmen liquefeito são colocados sobre uma lâmina de microscopia e recobertos com lamínula e avaliada sob microscopia óptica com contraste de fase utilizando magnificação de quatrocentas vezes. Podemos observar espermatozoides imóveis aderidos a células ou febris celulares (agregação) ou espermatozoides aderidos uns aos outros (aglutinados);

B.2 Motilidade

Foi definida como o movimento espontâneo dos espermatozoides. Uma alíquota do sêmen liquefeito foi avaliada sob microscopia óptica de contraste de fase com aumento de duzentas vezes à temperatura 37 °C. Foram classificadas em três padrões de motilidade segundo (OMS, 2010):

- Motilidade progressiva (PR): espermatozoides se movem ativamente, de forma linear ou em círculo grande, independentemente da velocidade;
- Motilidade não progressiva (NP): todos os outros padrões de motilidade com ausência progressão. Movimentam-se em pequenos círculos, a força flagelante dificilmente deslocando a cabeça, ou quando apenas a batida flagelar pode ser observada; e
- Imóveis (IM)

Quando se discute a motilidade dos espermatozoides, é importante especificar a motilidade total (PR + NP) ou motilidade progressiva (PR) (OMS, 2010).

B.3 Concentração

A contagem dos espermatozoides foi realizada em câmara de Neubauer modificada e determinada, contando-se o número de espermatozoides presentes

nos 25 quadrados grandes (cinco fileiras) das duas câmaras, obtendo-se a média entre as duas contagens. Utilizou-se microscopia óptica comum com magnificação de duzentas vezes para a observação dos espermatozoides. Validaram-se os resultados com diferença entre as contagens das duas câmaras $<1/20$ da sua soma. A concentração de espermatozoides em milhões por mililitro de sêmen ($\times 10^6$ por ml) é resultante da média daqueles contados pelo fator de diluição da câmara.

A contagem total de espermatozoides (do ejaculado) foi obtida multiplicando-se o valor da concentração de espermatozoides pelo volume da amostra seminal, expresso em milhões de espermatozoides por volume ejaculado.

B.4 Morfologia

A morfologia é definida com base na forma e pelo aspecto dos espermatozoides segundo critérios de Kruger definidos como padrão de normalidade: cabeça de forma oval e lisa (possuindo de 5 μm a 6 μm de comprimento e de 2,5 a 3,5 μm de largura; acrossomo compreendendo de 40% a 70% do segmento cefálico e peça intermediária com menos de 1 μm de largura e comprimento aproximado de 1,5 vez o tamanho do segmento cefálico e sem apresentar defeito. Cauda deve ser uniforme, mais fina que a peça intermediária, comprimento aproximado de 45 μm , sem defeito, enrolada, quebrada ou curta. As formas limítrofes foram consideradas anormais.

A análise da morfologia foi realizada preparando-se um esfregaço com 5 μl de sêmen liquefeito em uma lâmina de microscopia previamente limpa com álcool 70%, fixada primeiro com metanol e corada seguidamente por Eosina e Nigrosina (contrasta as células do fundo claro do microscópio) e contagem mínima de duzentos espermatozoides classificados como normais e anormais.

-Forma normal avaliou-se as dimensões e o aspecto dos espermatozoides sob magnificação de mil vezes (imersão), com o auxílio de um micrômetro acoplado à ocular do microscópio óptico. O resultado é expresso em porcentagem de formas ovais normais;

-Formas anormais, calculou-se o percentual de espermatozoides exibindo defeitos no segmento cefálico, peça intermediária, cauda e aqueles com excesso de citoplasma residual.

B.5 Vitalidade

Foi determinada pela propriedade do corante eosina de só corar espermatozoides mortos cujas membranas não estão intactas (espermatozoide corado de rosa). Duzentos espermatozoides foram avaliados utilizando-se microscopia óptica com objetiva de imersão (magnificação de mil vezes). Este teste só foi verificado para amostras mais de 60% de espermatozoides imóveis.

B.6 Leucócitos

Uma alíquota de sêmen liquefeito é incubada com reagente contendo água oxigenada. Em seguida são analisadas pelo menos duzentas células entre elas a porcentagem de células peroxidase positivas. A concentração de neutrófilos foi calculada, multiplicando-se a concentração de células redondas ($\times 10^6/\text{ml}$) pela porcentagem de neutrófilos (células peroxidase positivas).

ANEXO B – PARECER CEP/FS-UNB



FACULDADE DE CIÊNCIAS DA
SAÚDE DA UNIVERSIDADE DE
BRASÍLIA - CEP/FS-UNB



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Efeito da Inflamação Sistêmica na Qualidade do Sêmen de Pacientes Renais Crônicos Submetidos à Hemodiálise: Análise dos Níveis de Ferritina e Transferrina Seminal

Pesquisador: GILMAR PEREIRA SILVA

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 53172316.9.0000.0030

Instituição Proponente: FACULDADE DE SAÚDE - FS

Patrocinador Principal: EMPRESA BRASILEIRA DE SERVICOS HOSPITALARES - EBSEH

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.552.346

Apresentação do Projeto:

De acordo com o pesquisador:

Resumo:

A disfunção gonadal (DG) é uma condição clínica observada no curso de muitas doenças agudas ou crônicas como resultado da ação de toxinas endógenas ou exógenas, processos inflamatórios geradores de citocinas e acúmulo sérico de certas substâncias seja por alteração do clearance; seja pela inativação deficiente por órgãos ou sistemas competentes. Quaisquer das fontes promovem disfunção gonadal por interferência direta ou indireta no eixo hipotálamo-hipofise-gonadal com reflexo direto nos hormônios séricos. Uma parcela importante de doentes renais crônicos (DRC) terminais padecem desta entidade por estarem submetidos a uremia permanente e a processo inflamatório crônico sistêmico que alcança 40 a 70% deles denunciado pela presença elevada da Proteína C Reativa (PCR) e várias citocinas. A DG masculina neste grupo de paciente é estudada sob a ótica das alterações séricas dos níveis hormonais com seu reflexo na qualidade do sêmen, sem quantificar a possível contribuição de alterações intratesticulares promovidas pela ação direta destes fatores sobre a glândula. Excluindo-se o fator urêmico por ser uma condição permanente e comum a todos DRC e a inexistência de algum marcador intraglandular ligado a esta condição clínica, resolveu-se investigar a possível contribuição das alterações intratesticulares para

Endereço: Faculdade de Ciências da Saúde - Campus Darcy Ribeiro

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.910-900

UF: DF

Município: BRASÍLIA

Telefone: (61)3107-1947

E-mail: cepfsunb@gmail.com



FACULDADE DE CIÊNCIAS DA
SAÚDE DA UNIVERSIDADE DE
BRASÍLIA - CEP/FS-UNB



Continuação do Parecer: 1.552.346

instalação da disfunção testicular promovidas pela inflamação sistêmica, analisando-se no sêmen duas proteínas secretadas pela glândula envolvidas no metabolismo de ferro, sensíveis aos efeitos da inflamação e com funções fisiológicas locais importantes no processo complexo de espermatogênese: a transferrina seminal (Tfs) e ferritina seminal (Fts). Para tanto, hipotetiza-se que o fator inflamatório sistêmico pode alterar os níveis intratesticulares destas proteínas e explicar parcialmente as alterações espermáticas encontradas nestes pacientes, contribuindo para o melhor entendimento do complexo mecanismo de DG, especialmente a infertilidade. O estudo será realizado nos pacientes do sexo masculino cadastrados no Serviço de Hemodiálise (SH) do Hospital Universitário de Brasília (HUB) e os exames laboratoriais realizados no Laboratório de Análise Clínica (LAC) do mesmo hospital.

Metodologia Proposta:

O estudo a ser realizado em 80 pacientes do sexo masculino cadastrados no Serviço de Hemodiálise (SH) do Hospital Universitário de Brasília (HUB) há mais de seis meses. Todos os exames laboratoriais do estudo serão realizados no Laboratório de Análise Clínica (LAC) do mesmo hospital.

1. Amostras, estudo e seleção, utilizando-se como amostra, paciente Renal Crônico Hemodialítico (RCHD) do sexo masculino e usuário do SH do HUB que aceitar espontaneamente participar do estudo conforme as normas éticas vigentes.

A amostra será constituída de 60 casos de RCHD, com idade entre 18 a 60 anos, subdivididos em subgrupos de pacientes com e sem inflamação segundo nível sérico de PCR > 5mg/ml e não inflamado, < 5mg/ml, respectivamente, conforme sugerido pela K/DOQI/2006(20)- Kidney Disease Outcomes Quality Initiative-Plano de Qualidade dos Desfechos das Doenças Renais da Fundação Nacional do Rim.

E 20 casos controles constituídos de pacientes saudáveis, de mesma faixa etária, sem nenhuma comorbidade clínica conhecida, afastando-se status inflamatório na investigação clínica, considerando-se PCR plasmática 3,0 mg/l.

Critério de Inclusão:

1. RCH de idade entre 18 e 60 anos há mais de seis meses em hemodálises;
2. Ausência de hepatopatia aguda ou crônica;
3. Ausência de sinal clínico/ laboratorial de infecção/inflamação aguda ou crônica: HbsAg (+), VHC(+), HIV(+), infecção do acesso; e
4. Ausência de Traumatismo testicular recente, infecção genito urinário, prostatitis, orquiepididimites e vasectomizados.

Endereço: Faculdade de Ciências da Saúde - Campus Darcy Ribeiro

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.910-900

UF: DF

Município: BRASÍLIA

Telefone: (61)3107-1947

E-mail: cepfsunb@gmail.com



Continuação do Parecer: 1.552.346

Critério de Exclusão:

Dar-se-á pelo não enquadramento no item 1 ou a presença de pelo menos uma condição contida nos itens de inclusão de 2 a 4

Metodologia de Análise de Dados:

Após aplicar teste de normalidade nas diferentes variáveis amostrais (Shapiro-Wilk), verifica-se a se há relação entre os níveis de Fts e Tfs seminais

de paciente com e sem inflamação com as diferentes variáveis qualificadoras importantes do sêmen, utilizando-se os testes de Spearman ou Pearson conforme distribuição de normalidade encontrada. Para verificar se há diferenças entre três variáveis quantitativas independentes (teste de Kruskal-Wallis); com duas variáveis (teste de Mann-Whitney). Considera-se estatisticamente significativa $p < 0,05$ para rejeitar hipótese nula.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Geral: Verificar se a inflamação sistêmica é capaz de alterar a qualidade do sêmen de paciente renal crônico hemodialítico através da mensuração dos níveis de ferritina e transferrina seminal.

Objetivo Secundário:

- a) Determinar a concentração média de ferritina/transferrina seminal em homem adulto saudável e renal crônico hemodialítico com e sem inflamação;
- b) Comparar os níveis de ferritina/transferrina seminal entre pacientes renais crônicos hemodialíticos com e sem inflamação; e
- c) Correlacionar os níveis de ferritina/transferrina seminal com os parâmetros numéricos e funcionais do espermograma

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Segundo o pesquisador:

1. Eventual risco decorrente de sua participação na pesquisa e mancha roxa no local que é controlada pela compressão e gelo local; e
2. Outros eventuais danos em dimensões, psíquica, moral, intelectual, social, cultural ou espiritual serão minimizados ou excluídos por esclarecimentos de entrevista: antes, durante e depois da realização da pesquisa.

Benefícios:

Melhor entendimento da participação do fator inflamatório no complexo mecanismo de infertilidade masculina com vista ao estabelecimento de futuras estratégias terapêuticas que minimizem esta condição.

Endereço: Faculdade de Ciências da Saúde - Campus Darcy Ribeiro

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.910-900

UF: DF

Município: BRASÍLIA

Telefone: (61)3107-1947

E-mail: cepfsunb@gmail.com



Continuação do Parecer: 1.552.346

Outros	Curriculum_Pesquisador.doc	21/01/2016 01:18:39	GILMAR PEREIRA SILVA	Aceito
Outros	Curriculum_Orientador.doc	21/01/2016 01:16:25	GILMAR PEREIRA SILVA	Aceito
Outros	Cartaencaminhamentoprojeto.doc	21/01/2016 01:05:07	GILMAR PEREIRA SILVA	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Pesquisador.PDF	21/01/2016 01:02:15	GILMAR PEREIRA SILVA	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Concordancia2.docx	21/01/2016 00:17:33	GILMAR PEREIRA SILVA	Aceito
Cronograma	Cronograma.doc	21/01/2016 00:13:38	GILMAR PEREIRA SILVA	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

BRASILIA, 19 de Maio de 2016

Assinado por:
Keila Elizabeth Fontana
(Coordenador)

Endereço: Faculdade de Ciências da Saúde - Campus Darcy Ribeiro**Bairro:** Asa Norte**CEP:** 70.910-900**UF:** DF**Município:** BRASILIA**Telefone:** (61)3107-1947**E-mail:** cepfsunb@gmail.com

APÊNDICE A - ARTIGO I

Seminal Ferritin and Seminal Parameters in Patients Undergoing Chronic Hemodialysis

Gilmar Pereira Silva¹,
Fabiana Pirani Carneiro²,
Vitor Pereira Xavier
Grangeiro³

ORIGINAL

Abstract

Background: to verify the association of seminal parameter (SP) and seminal ferritin (SF) levels in patients undergoing chronic hemodialysis (CH), admitting possible antioxidative activity of SF.

Methods: This was a case-control study in group of 60 men (case) in CH with more than 6 months and group of healthy men (control), aged 18-60 years, without clinical or laboratory signs of infection/inflammation. Patients underwent semen analysis, fertility index (FI) calculation, measurement of SF and hormonal profile (follicle-stimulating hormone, luteinizing hormone, total testosterone, and prolactin levels).

Results: There were significant differences between cases and control (**Table 1**) in SP ($p = 0.000$), sex hormone ($p = 0.000$) and FI [0.85 (0.57) vs 5.54 (1.3), $p=0.000$]. There was no difference between cases and control (**Table 1**) in SF levels (226.45 ± 51.03 vs 241.52 ± 30.52 , $p = 0.137$) and age (49.47 ± 5.56 vs 47.90 ± 6.22 , $p=0.229$). There was no correlation (**Table 2**) between SF and FI ($r = 0.049$, $p = 0.711$) and SP ($p > 0.05$).

Conclusion: The results suggest that SF is not associated with changes in seminal parameters in patients undergoing chronic hemodialysis, and is not useful singly for initial evaluation of seminal parameters.

- 1 Urologist of the University of Brasilia, Brasilia, Federal District, Brazil.
- 2 Professor of the Faculty Medicine of University of Brasilia, Brasilia, Federal District, Brazil.
- 3 Academic of the Medical Course of the School of Medical Sciences, João Pessoa, Paraíba, Brazil.

Contact information:

Gilmar Pereira Silva.

Address: Hotel Sector North, Quatrain 01, Block D, Apartment 1716, Fusion Work Live Building, Postal Code: 70701-040. Federal District, Brasília, Brazil.
Tel/fax: +556138771773.

gilpsilva2006@gmail.com

Keywords

Chronic Renal Disease; Seminal Parameters; Semen Quality; Male Infertility; Seminal Ferritin; Sexual Hormone.

Introduction

Subfertility and infertility in patients with chronic kidney disease (CKD)/hemodialysis (HD) is frequently encountered, presenting as a reduction in one or more seminal parameters (SP) (concentration, motility, morphology, and vitality of spermatozoa) [1]. Semen quality is the result of the synchronic interaction of several factors involved in the complex spermatogenesis process, including genetic, hormonal, immunological, oxidative, and inflammatory factors [2]. DRC/HD is characterized by an increase in oxidative stress (OS) and inflammation [3]. Is accepted the association between OS and increased synthesis of proinflammatory cytokines such as interleukin-6 (IL-6), tumor necrosis factor α (TNF- α) induced by the activation of nuclear factors such as kappa nuclear factor B (FN- κ B) [3]. Or activator protein-1 (PA-1) [3] and consequent elevation of acute phase reaction proteins such as fibrinogen and C-reactive protein (CRP), suggesting that CKD is a low-grade chronic inflammatory state [4] OS is one of the main factors responsible for subfertility and infertility in humans [5]. Evaluation of seminal SO is usually performed by measuring the total antioxidative capacity of the semen (evaluating the enzymatic and non-enzymatic systems) or individualized lipid peroxidation by-products, such as malonaldehyde (MDA), protein (carbonyls), nucleic acids (oxidized nitrogen bases), and carbohydrates (glycosylation products) [6]. Few studies have separately evaluated seminal OS via the non-enzymatic antioxidant system.

The different isoforms of ferritins, in addition to the intracellular iron ion storage function, they are admitted antioxidant function by controlling the iron ions in the intracellular environment by chelation mechanism [7].

Objective

Considering the low quality of semen observed frequently in CKD/HD patients, it was decided to verify the possible association between seminal ferritin (SF) levels and seminal parameters in patients

on chronic hemodialysis, hypothesizing possible SF antioxidative activity.

Methods

Recruitment, inclusion and exclusion

Prospective study of prevalence in the Hemodialysis Sector of the University Hospital of the University of Brasília, between July 2016 and December 2016, after approval by the Research Ethics Committee of the Faculty of Health Sciences of the University of Brasília under number 53172316.9.0000.0030. Inclusion criteria were: age between 18 to 60 years, has been in HD for more than 6 months (cases) and absence of acute or chronic liver disease. Exclusion criteria were the presence of hemochromatosis or diseases of iron metabolism. Were not included in the study patients with hypogonadism and clinical conditions that could alter SF levels such as recent history of genitourinary tract infection, clinical signs of acute or chronic infection/inflammation, positive serology for hepatitis B, C and HIV, vascular access infection, leukocytosis, fever, hypoproteinemia. Sample consisting of 60 men (case) in high flow HD by vascular fistula access, 3x week with duration of 4 hours/HD session and 30 healthy men (control) from the health promotion outpatient clinic of the same hospital with normal renal function, this is, above 90mls/min/1.73m² and a normal CRP value (≤ 1 mg/L) considered for a low cardiovascular risk [8].

Routine collection of blood and semen

The blood sample for analysis was collected from the arteriovenous fistula immediately before the first weekly hemodialysis session in the case group and on a previously scheduled day for the control group, always between 8:00 and 10:00 a.m. in the clinical laboratory of the same hospital. Were measured SF, follicle-stimulating hormone (FSH); luteinizing hormone (LH); prolactin (PRL) and total testosterone (TT). On the same day of blood collection,

the semen was collected by voluntary masturbation in an appropriate environment at 37° C to perform spermogram by manual method according to the guidelines of the WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen 5th ed [9] and seminal plasma preparation, centrifuging at 3500 × g for 20 min after 30 minutes liquefaction. The supernatant was collected into a new tube and held at -20° C for the measurement SF. SF and sex hormones (SH) were measured by enzyme immuno-chemiluminescence using the Immulite 2000/Siemens automatic analyzer. Specific kits were used for quantification, as well as calibrators and controls recommended by the manufacturer.

Fertility Index (FI)

IF was calculated according to Harvey [10] as follows: FI = sperm concentration (x 10⁶/ml) x sperm motility x percentage of spermatozoa with normal morphology.

Statistical analysis

After the normal distribution curve of the sample was verified by normality tests, for differences between two independent quantitative variables was used t-test and Pearson correlation analysis. Statistical significance was set at p <0.05 to reject the null hypothesis. Used SPSS[®] for Windows, version 20.0

Results

There were significant differences between cases and control (**Table 1**) in SP (p = 0.000), sex hormone (p = 0.000) and FI [0.85 (0.57) vs 5.54 (1.3), p=0.000]. There was no difference between cases and control (**Table 1**) in SF levels (226.45 ± 51.03 vs 241.52 ± 30.52, p = 0.137) and age (49.47 ± 5.56 vs 47.90 ± 6.22, p=0.229).There was no correlation (**Table 2**) between SF and FI (r = 0.049, p = 0.711) and SP (p> 0.05).

Table 1. Comparative evaluation of age, semen and hormone parameters, index and ferritin seminal levels among groups case and control (x ± sd).

Observational parameters	Case n (60)	Control n (30)	p ^a -values
Age (y)	49.47 ± 5.56	47.90 ± 6.22	0.229
Semen volume (ml)	01.33 ± 00.36	02.77 ± 0.44	0.000
Total motility (PR + NP, %)	34.00 ± 06.24	71.31 ± 7.86	0.000
Sperm vitability (%)	47.49 ± 07.31	64.41 ± 2.89	0.000
Sperm density (x 10 ⁶ /ml)	14.95 ± 06.18	50.21 ± 8.57	0.000
Morphology sperm (%)	25.40 ± 07.87	59.76 ± 10.58	0.000
FSH (mIU/ml)	06.30 ± 01.21	03.40 ± 00.48	0.000
LH (mIU/ml)	15.91 ± 02.62	02.84 ± 00.54	0.000
Testosterone (ng/dl)	411.03 ± 58.88	510.60 ± 92.56	0.000
Prolactin (ng/ml)	16.38 ± 02.92	05.86 ± 01.93	0.000
Fertility index	0.85(0.57)	5.54(1.3)	0.000
Ferritin seminal (ng/ml)	226.45 ± 51.03	241.52 ± 30.52	0.137

PR: Progressive motility; NP: non-progressive motility; FSH: follicle-stimulating hormone; LH: luteinizing hormone; ^a: t tests

Table 2. Correlational evaluation Pearson` between seminal ferritin and seminal parameters in group of case (p < 0.05 significative).

Observational Parameters	Case (n=60)	
	r	p
Seminal ferritin		
Fertility index	0.049	0.711
Sperm motility	-0.005	0.971
Sperm viability	-0.088	0.504
Sperm density	-0.007	0.960
Sperm morphology	0.003	0.980

Discussion

The present study intends to add knowledge in the understanding of the changes observed in the SP of patients with CKD, especially in HD, studying the possible association of SF levels with these alterations, considering possible antioxidative activity attributed to SF. This activity is due to its physiological function of regulating intracellular iron ion concentration, avoiding excessive formation of Fe^{++} by the reduction of free iron (Fe^{+++}) by anion (O_2^-), not favoring the biochemical reactions of Fenton and Haber-Weiss generating the hydroxyl radical ($\bullet OH$), most reactive of ROS responsible for peroxidation of lipid, protein, glycodes and fragmentation of DNA [11].

SF is an isoform of the different ferritins found in humans tissues, abundant in human seminal plasma; it is primarily produced and secreted (80%) by Sertoli cells [12] sensitive to systemic or local inflammatory changes [13].

On the other hand, Spermatogenesis is an iron-dependent process, because developing male germ cells undergo many mitotic divisions and require iron for DNA synthesis and cell growth, in particular for mitochondriogenesis. In addition, maturing spermatids and spermatozoa are extremely vulnerable to oxidative stress, implying a need for a well-balanced iron homeostasis in the seminiferous tubule [14]. This may partially justify the high concentrations of this protein in seminal plasma.

The similar age between the groups studied ($p > 0.05$) ensures greater reliability in the interpretation of the results and in the comparative statistical analysis of the impact of age on outcome variable [15].

Sex hormones (SH)

The most commonly observed male sex hormones (SH) profile in patients with CKD/HD is elevated serum levels of follicle stimulating hormone, luteinizing hormone, and prolactin and decreased serum TT levels, in response to the inhibitory action in one

or more sites of the hypothalamic-pituitary-gonadal (HPG) axis promoted by factors such as uremia, OS, and pro-inflammatory cytokines generated by CKD/HD [16]. The SH profile (**Table 1**) between case and control follows the previously described pattern, with significant differences between them ($p=0.000$). These results are corroborated by previous reports [1, 17]. The absence of clinical hypogonadism in the sample, in principle, removes the interference of the hormonal factor on SP, FI, and SF levels.

Fertility Index (FI) and Seminal Parameters (SP)

The FI was significantly lower in the case group than in the control group ($p = 0.000$). Our results are in agreement with results obtained by other authors in similar studies. Xu et al [18] in the study of the semen quality in (40) uremic patients, (40) transplanted renal patients, and (40) healthy and fertile men, found higher IF for healthy patients in relation to transplanted groups A and B and uremic, respectively, 13.02 (14.26); 5.53 (8.30); 9.27 (22.49) and 0.23 (0.76). Xu et al. [19], evaluating the effect of uremia on semen quality and reproductive function in 53 terminal uremic patients, comparing them with controls of 46 fertile and 46 infertile men. They found that the motility, survival rate, density and morphology of the remaining 46 uremic patients were significantly lower than controls. The uremic patients presented IF 0.68 (2.08) significantly lower than the fertile 7.7 (13.51) and infertile 4.13 (5.77). (**Table 1**)

Although the antioxidative activity of ferritin is admitted in thesis, its evidence in clinical practice is questioned, considering the limited number of studies about the theme. Kwenang et al. [20] analyzed levels of iron, copper, and ferritin in seminal plasma from young healthy students ($n=30$) and infertility ($n=30$) with severe teratospermia, and no significant differences were found between them. However, Ferreira et al. [21], analyzing the seminal plasma

oxidative/antioxidative capacity of 69 men with suspected infertility and their association with iron and SF levels, showed a positive correlation between SF and total antioxidant capacity ($p = 0.005$) and a negative correlation with OS index ($p = 0.02$, $r = -0.329$). They concluded that the measurement of SF can be useful in the evaluation of seminal oxidative/antioxidative status in studies of fertility and seminal oxidative stress.

The complex systemic inflammation and oxidative stress affecting 40-60% of patients with CKD in HD [22] is a clinical condition that can alter SF levels. It is accepted that SI is associated with increased synthesis and secretion of intratesticular proinflammatory cytokines by stimulation of macrophages, Sertoli cells, and Leydig cells with nonpermanent alterations in SP (subfertility and infertility), evidenced in animal models and human studies [23].

Study experimental in rodents demonstrated that IL-6 secreted by the Sertoli cell stimulates the production of intratesticular SF [24]. In the animal model, the induction of systemic inflammation by lipopolysaccharide injection (LPS) promoted unsustainable elevations in proinflammatory cytokines (TNF α , interferon gamma [IFN γ], IL-6, IL-12, IL-17, and IL-23). Decreases in SP and elevations of a lipid peroxidation marker (MDA) lasted up to 30 days after the inflammatory induction, with values returning to baseline values later [25]. In humans, Qian et al [26] verified the relationship between different cytokines in the semen samples of 57 patients with infertility, identifying a decrease in SP and a significant difference in IL-23 levels of semen in the normal (5.87 pg/mL) and abnormal (11.14 pg/mL) groups ($p < 0.001$), with positive correlations between IL-6, IL-8, and TNF- α . Kokabet et al [27] evaluated whether IL-6 and IL-8 concentrations and numbers of seminal leukocytes were related to chlamydial infection in a population of 255 men with infertility. Significantly, increased levels of IL-8, but not IL-6, were found in patients with trachomatis infection when compared with

uninfected patients, and there was a correlation between trachomatis infection and lower progressive motile sperm, as well as an increase in seminal leukocytes.

Silva et. al [28] studying effect of systemic inflammation on level of ferritin seminal in chronic renal male patient undergoing hemodialysis, using similar methodology, examined a sample of 60 patients on HD and did not find differences or correlations of SF levels among patients with inflammation, without inflammation, and controls ($p > 0.05$). Wan et al. [29] investigated the association between chlamydia trachomatis infection and the contents of seminal plasma ferritin, β -2-microglobulin, and total protein in seminal plasma of 30 fertile men (normal group) and 62 men with infertility infected by chlamydia trachomatis. They found higher concentrations of SF level in the infected group compared to healthy controls. It is plausible to hypothesize that disagreement is apparent for the behavior of SF levels of inflammation in the two previous studies. Silva et. al [28] evaluated patients with chronic systemic inflammation with consolidated adaptive process; Wan et al. [29] evaluated patients with acute local or subacute infection. With resolution of an acute infectious stimulus, proinflammatory cytokines and SF levels tend to normalize [30]. (**Table 2**)

Considering little known in the mechanism that causes of the low quality of semen and without correlation with SF levels in the group of patients studied, it is plausible to hypothesize that other factors are associated with the DRC/HD condition, besides the uremic factor, contribute to decrease the seminal quality as inflammation systemic (IS), OS or both by diverse mechanisms [2].

The similar level of SF in the case and control group identified in the present study may be partially justified by local immunosuppressive milieu and systemic immune tolerance are involved in maintaining testicular immune privilege status in response to uremic, IS, OS, isolated or associated factors. The

testicular immune privilege is a complex mechanism developed in the testicular compartment to maintain the balance local of pro/anti-inflammatory cytokine levels [31], involved in regulation the synthesis of SF [32] and intracellular iron ion level via the iron regulatory protein (IRP) [33]. Mechanisms of functional interactions between germ cells and Sertoli cells; Sertoli cells and Leydig cells, known as autocrine/paracrine regulation and hematopoietic barrier, are also part of the mechanism of testicular immune privilege protecting germ cells from effect inflammatory/oxidative/ionic toxicity [34]. The breakdown of homeostasis of one of these mechanisms may explain in part the genesis of changes in the seminal parameters of these patients. The present study presents the following limitations: absence of complementary analysis of seminal of OS and reduced sample.

Conclusion

The results suggest that SF levels are not associated with changes of seminal parameters in patients undergoing chronic hemodialysis and is not useful singly for initial evaluation of seminal parameters.

Abbreviations

Activator protein-1 (AP-1); c reactive protein (PCR); chlamydia trachomatis (CT); chronic kidney disease (CKD); factor-kappa B (NF- κ b); seminal ferritin (SF); follicle stimulating hormone (FSH); hemodialysis (HD); highly sensitive C-reactive protein (hs-PCR); hypothalamic-pituitary-gonadal (HPG); interleukins (IL); iron regulatory proteins (IRP); lipopolysaccharide (LPS); luteinizing hormone (LH); malonaldehyde (MDA); oxidative stress (OS); oxygen reactive oxygen Species (ROS); prolactin (PRL); seminal parameters (PS); sex hormones (SH); total antioxidative capacity (TAC); total testosterone (TT); tumor necrosis factor α (TNF- α)

Compliance with Ethical Standards

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Ethical approval

Approved by the Research Ethics Committee of the Faculty of Health Sciences of the University of Brasília under number 53172316.9.0000.0030.

Informed consent

Informed consent was obtained from all individual participants included in the Study.

Authors' contribution

GPS drafted the manuscript. and FPC and VPXG critically reviewed it and makes addition.

References

1. Zedan H, Kamal EE, El Shazly A, El Rahman MZA, Shawky A: Impact of renal failure and haemodialysis on semen parameters and reproductive hormones. *Human Andrology* 2013; 3:16-20.
2. Neto FTL, Bach PV, Najari BB, Li PS, Goldstein M: Spermatogenesis in humans and its affecting factors. *Semin Cell Dev Biol* 2016; 59:10-26.
3. Closa D, Folch-Puy E: Oxygen free radicals and the systemic inflammatory response. *IUBMB Life* 2004; 56:185-191.
4. Tucker PS, Scanlan AT, Dalbo VJ: Chronic kidney disease influences multiple systems: describing the relationship between oxidative stress, inflammation, kidney damage, and concomitant disease. *Oxid Med Cell Longev* 2015; 2015:806358.
5. Aitken RJ: Oxidative stress and the etiology of male infertility. *J Assist Reprod Genet* 2016; 33:1691-1692.
6. Pinchuk I, Shoval H, Dotan Y, Lichtenberg D: Evaluation of antioxidants: scope, limitations and relevance of assays. *Chem Phys Lipids* 2012; 165:638-647.
7. Bartosz G: Non-enzymatic antioxidant capacity assays: Limitations of use in biomedicine. *Free Radic Res* 2010; 44:711-720.
8. Willerson JT, Ridker PM: Inflammation as a cardiovascular risk factor. *Circulation* 2004; 109:12-10.
9. Organization WH: WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. 2010.
10. Harvey C: A fertility index derived from semen analysis. *J Clin Pathol* 1953; 6:232-236.

11. Silva B, Faustino P: An overview of molecular basis of iron metabolism regulation and the associated pathologies. *Biochim Biophys Acta* 2015; 1852:1347-1359.
12. Griswold MD: *Sertoli Cell Biology*. Academic Press, 2014.
13. Watt RK: The many faces of the octahedral ferritin protein. *Biomaterials* 2011; 24:489-500.
14. Chen H, Mruk D, Xiao X, Cheng CY: *Human Spermatogenesis and Its Regulation; Male Hypogonadism*, Springer, 2017, pp 49-72.
15. Somigliana E, Paffoni A, Busnelli A, Filippi F, Pagliardini L, Vigano P, Vercellini P: Age-related infertility and unexplained infertility: an intricate clinical dilemma. *Hum Reprod* 2016; 31:1390-1396.
16. Palmer BF, Clegg DJ: Gonadal dysfunction in chronic kidney disease. *Rev Endocr Metab Disord* 2016.
17. Lehtihet M, Hylander B: Semen quality in men with chronic kidney disease and its correlation with chronic kidney disease stages. *Andrologia* 2015; 47:1103-1108.
18. Xu LG, Xu HM, Zhu XF, Jin LM, Xu B, Wu Y, Lu NQ: Examination of the semen quality of patients with uraemia and renal transplant recipients in comparison with a control group. *Andrologia* 2009; 41:235-240.
19. Xu L, Xu H, Zhu X, Zhang J, Ma M, Shi X: Effect of uremia on semen quality and reproductive function in humans. *Cell Biochem Biophys* 2012; 62:29-33.
20. Kwenang A, Kroos MJ, Koster JF, van Eijk HG: Iron, ferritin and copper in seminal plasma. *Hum Reprod* 1987; 2:387-388.
21. Ferreira J, Pio C, Lima ES: A dosagem da ferritina no plasma seminal pode ser um marcador do estresse oxidativo no sêmen. *News Lab* 2009.
22. Maeda Y, Inoguchi T: [Oxidative stress and chronic inflammation]. *Nihon rinsho Japanese journal of clinical medicine* 2016; 74 Suppl 2:73-76.
23. Fraczek M, Kurpisz M: Cytokines in the male reproductive tract and their role in infertility disorders. *J Reprod Immunol* 2015; 108:98-104.
24. Elhija MA, Potashnik H, Lunenfeld E, Potashnik G, Schlatt S, Nieschlag E, Huleihel M: Testicular interleukin-6 response to systemic inflammation. *European cytokine network* 2005; 16:167-172.
25. Collodel G, Moretti E, Brecchia G, Kuželová L, Arruda J, Mourvaki E, Castellini C: Cytokines release and oxidative status in semen samples from rabbits treated with bacterial lipopolysaccharide. *Theriogenology* 2015; 83:1233-1240.
26. Qian L, Sun G, Zhou B, Wang G, Song J, He H: Study on the relationship between different cytokines in the semen of infertility patients. *Am J Reprod Immunol* 2011; 66:157-161.
27. Kokab A, Akhondi MM, Sadeghi MR, Modarresi MH, Aarabi M, Jennings R, Pacey AA, Eley A: Raised inflammatory markers in semen from men with asymptomatic chlamydial infection. *J Androl* 2010; 31:114-120.
28. Silva GP, De La Vega Elena CD, Carneiro FP, Veiga JPR: Effect of systemic inflammation on level of ferritin seminal in chronic renal male patient undergoing hemodialysis. *Int Arch Med* 2014; 7:23.
29. Wan Changchun WZHAOBR: The relation between chlamydia trachomatis infection and the contents of seminal plasma ferritin, β_2 -Microglobulin and total protein (Chinese Journal of Andrology) 2003, 01. *Chinese Journal of Andrology* 2003; 1:37-38.
30. Brecchia G, Menchetti L, Cardinali R, Castellini C, Polisca A, Zerani M, Maranesi M, Boiti C: Effects of a bacterial lipopolysaccharide on the reproductive functions of rabbit does. *Anim Reprod Sci* 2014; 147:128-134.
31. Fijak M, Bhushan S, Meinhardt A: *The Immune Privilege of the Testis; Immune Infertility*, Springer, 2017, pp 97-107.
32. Chen Q, Deng T, Han D: Testicular immunoregulation and spermatogenesis. *Semin Cell Dev Biol* 2016; 59:157-165.
33. Zhang D-L, Ghosh MC, Rouault TA: The physiological functions of iron regulatory proteins in iron homeostasis - an update. *Front Pharmacol* 2014; 5.
34. Meinhardt A, Hedger MP: Immunological, paracrine and endocrine aspects of testicular immune privilege. *Mol Cell Endocrinol* 2011; 335:60-68.

Publish in International Archives of Medicine

International Archives of Medicine is an open access journal publishing articles encompassing all aspects of medical science and clinical practice. IAM is considered a megajournal with independent sections on all areas of medicine. IAM is a really international journal with authors and board members from all around the world. The journal is widely indexed and classified Q2 in category Medicine.

APÊNDICE B – ARTIGO II

Seminal transferrin in the seminal quality evaluation of hemodialytic patients

Gilmar Pereira Silva ¹, Fabiana Pirani Carneiro ¹, Vitor Pereira Xavier Grangeiro ²

¹ University of Brasilia, Brasilia, Federal District, Brazil;

² Faculty of Medical Sciences, João Pessoa, Paraíba, Brazil.

Summary

Objective: to verify the association between seminal quality and seminal transferrin (ST)

level and fertility index in patients undergoing chronic hemodialysis (CH).

Material and methods: This is a cross-sectional study in a group of 60 men (case) undergoing CH for more than 6 months, and a group of 30 healthy men (control), aged 18-60 years, without clinical or laboratory signs of infection/inflammation. Spermogram was performed, fertility index (FI) was calculated and ST and sex hormones (SH) levels were measured, including follicle-stimulating hormone, luteinizing hormone, total testosterone, and prolactin.

Results: All individuals were eugonadal. No differences for age (49.47 ± 5.56 , 47.90 ± 6.2 , $p = 0.22$) were observed between cases and controls, whereas there were significant differences between the individuals in the case and control groups with respect to the mean FI ($p = 0.000$), seminal parameters (SP) ($p = 0.000$), and ST levels (40.12 ± 08.25 vs 73.32 ± 06.8 , $p = 0.000$). ST levels were correlated with FI ($r = 0.787$, $p = 0.00$) and SP (motility: $r = 0.857$, $p = 0.000$; vitality: $r = 0.551$, $p = 0.000$; density: $r = 0.850$, $p = 0.000$; normal morphology: $r = 0.386$, $p = 0.000$). Linear regression model showed relationship of ST levels with total sperm motility ($R^2 = 0.701$; $p = 0.000$) and and FI ($R^2 = 0.569$; $p = 0.000$).

Conclusions: Our results suggest that seminal quality is associated with ST levels and FI and that it can be used the initial investigation of subfertility/infertility of patients undergoing chronic hemodialysis..

KEY WORDS: Chronic kidney disease; Hemodialysis; Male infertility; Seminal transferrin; Seminal quality; Seminal parameters.

Submitted ???

MATERIALS AND METHODS

Recruitment, inclusion and exclusion

A cross-sectional study was realized in the Hemodialysis Sector of the University Hospital of the University of Brasília, between July 2016 and December 2016, after approval by the Research Ethics Committee of the Faculty of Health Sciences of the University of Brasília under number 53172316.9.0000.0030.

Inclusion criteria were: age between 18 to 60 years, has been in hemodialysis (HD) for more than 6 months (cases) and absence of acute or chronic liver disease. Exclusion criteria were the presence of hemochromatosis or diseases of iron metabolism.

Patients with hypogonadism and clinical conditions that could alter ST levels such as recent history of genitouri-

nary tract infection, clinical signs of acute or chronic infection/inflammation, positive serology for hepatitis B, C and human immunodeficiency virus (HIV), vascular access infection, leukocytosis, fever, hypoproteinemia were not included in the study. Sample consisted of 60 men (cases) in high flow HD by vascular fistula access, 3x week with duration of 4 hours/HD session and 30 healthy men (control) from the health promotion outpatient clinic of the same hospital without injury of renal function (glomerular filtration rate \geq than 90 ml/min per 1.73 m²) and sperm without changes.

Routine collection of blood and semen

The blood sample for analysis was collected from the arteriovenous fistula immediately before the first weekly hemodialysis session in the case group and on a previously scheduled day for the control group, always between 8:00 and 10:00 a.m. in the clinical laboratory of the same hospital to assay ST, follicle stimulating hormone (FSH); luteinizing hormone (LH) and total testosterone (TT). On the same day of blood collection, the semen was collected by voluntary masturbation in an appropriate environment to perform spermogram by manual method according to the guidelines of the World Health Organization (WHO) laboratory manual for the examination and processing of human semen 5th ed (1). The seminal plasma was prepared by centrifuging at $3500 \times g$ for 20 min after 30 minutes liquefaction. The supernatant was collected into a new tube and held at $-20^\circ C$ for the measurement of ST levels.

ST and hormones were measured by enzyme immunochemiluminescence using the Immulite 2000/Siemens automatic analyzer. Specific kits were used for quantification, as well as calibrators and controls recommended by the manufacturer.

Fertility Index (FI)

FI was calculated according to Harvey (2) as follows: FI = sperm concentration ($\times 10^6/ml$) \times sperm motility \times percentage of spermatozoa with normal morphology.

Statistical analysis

After the normal distribution curve of the sample was verified by normality tests (Shapiro-Wilk), for difference

Table 1.

Comparative evaluation of age, semen and hormone parameters, fertility index and transferrin seminal levels among case and control groups ($x \pm sd$).

Observed parameters	Case n(60)	Control n(30)	P values
Age(y)	49,47±5,56	47,90±6,22	0,229
Semen volume(ml)	01,33±00,36	02,77±0,44	0,000
Total motility(PR+NP%)	34,00±06,24	71,31±7,86	0,000
Sperm viability(%)	47,49±07,31	64,41±2,89	0,000
Sperm density(x10 ⁶ /ml)	14,95±06,18	50,21±8,57	0,000
Morphology sperm(%)	25,40±07,87	59,76±10,58	0,000
FSH(mIU/ml)	06,30±01,21	03,40±00,48	0,000
LH(mIU/ml)	15,91±02,62	02,84±00,54	0,000
Testosterone(ng/ml)	04,11±00,58	05,10±00,92	0,000
Prolactin(ng/ml)	16,38±02,92	05,86±01,93	0,000
Fertility index	0,85(0,57)	5,54(1,3)	0,000
Seminal transferrin(ng/ml)	40,12±08,25	73,32±06,81	0,000

PR - Progressive motility; NP - non-progressive motility; FSH - follicle-stimulating hormone; LH - luteinizing hormone; α - t tests.

Table 2.

Correlational evaluation Pearson' between seminal transferrin and fertility index and seminal parameters in case group.

Observed parameters	Case n (60)	
	r	p
Fertility index	0,787	0,000
Seminal Sperm motility	0,857	0,000
transferrin Sperm viability	0,551	0,000
versus Sperm density	0,850	0,000
Sperm morphology	0,386	0,002

between two independent quantitative variables was used t-test and Pearson correlation analysis. Statistical significance was set at $p < 0.05$ to reject the null hypothesis. SPSS® for Windows, version 24.0 was used.

RESULTS

All sample of patients were eugonadics (normal LH, FSH, TT). No difference for age was observed between cases and controls (49.47 ± 5.56 , 47.90 ± 6.2 , $p = 0.229$), whereas significant differences between case and control means were observed for FI ($p = 0.000$), seminal parameters (SPs) ($P = 0.000$) and ST levels (40.12 ± 08.25 vs 73.32 ± 06.8 , $p = 0.000$). ST maintained correlation (Table 2) with FI ($r = 0.787$, $p = 0.00$) and SPs (motility $r = 0.857$ and $p = 0.000$; vitality $r = 0.551$ and $p = 0.000$; density $r = 0.850$ and $p = 0.000$ and normal morphology $r = 0.386$ and $p = 0.000$) and without hormones corrections ($p > 0,05$). The positive relationships between ST and sperm concentration and fertility index in group case can be explained by the linear regression model in up to 72.2% and 56.9%, respectively.

DISCUSSION

This study is of great importance because it is the first to verify the association between ST levels and SP and FI in patients undergoing HD. The practicality and low cost of

the ST measurement can be attractive for the initial evaluation of semen quality in patients undergoing HD with suspected subfertility/infertility.

ST is an isoform of the human transferrin family that is found abundantly in human seminal plasma; it is produced and secreted (80%) by Sertoli cells (3). It is sensitive to systemic and site inflammatory changes, and is involved in transport of iron ions in the systemic or site compartments (4). Distribution of the mean values of the parameters evaluated in case and control groups can be observed in Figure 1.

The similar age ($p = 0.229$) and eugonadal status ($p = 0.000$) (Table 1) of the studied individuals ensures greater reliability, and it lowers the impact on the analysis and interpretation of these variables.

The male hormonal profile most commonly observed in patients in HD includes elevated serum levels of FSH, LH, and decreased levels of TT in response to the inhibitory action of one or more hypothalamic-pituitary-gonadal axis sites (5). These changes are promoted by factors such as uremia, oxidative stress (OS) and pro-inflammatory cytokines present in HD (4). The hormones profile (Table 1) in the case group in our

study followed partially the pattern described above and found by other Authors (6, 7) that is high levels of FSH and LH although TT levels were within the limits of normality (eugonadics). Absence of clinical hypogonadism, in this study, minimizes the effect of hormonal factors in the pathophysiology of the changes found in the ST and seminal parameter. In the present study there was no relationship ($P > 0.05$) between ST levels and hormones (Table 2) which is corroborated by studies of Fuse (8) and Ber (9). However, there are studies that show as Tfs was inversely correlated with serum levels of LH, FSH and prolactin (10, 11).

ST levels found were significantly lower in the cases in relation to control in agreement with previous studies conducted by different researchers in non-uremic populations with suspected sub/infertility. Kosar et al. (12) found values of 58.1 ± 14.4 $\mu\text{g/ml}$ vs 108.4 ± 17.5 $\mu\text{g/ml}$ ($p < 0.0001$); Bharshankar and Bharshankar (13) 2.63 ± 1.76 mg/dl vs 5.35 ± 2.07 mg/dl ($p < 0.001$) and Saeed et al. (14) 54.0 $\mu\text{g/ml}$ (50.0-60, 0) vs 74.0 $\mu\text{g/ml}$ (69.0-80.0) ($p < 0.01$).

The explanation of the decrease in mean ST levels in unhealthy men in sub/infertility studies are not well known, but it is hypothesized that it is due to the action of interleukin-6 (IL6) in testis to reduces transferrin secretion in Sertoli cells (15).

All sperm cell parameters evaluated (Table 1) were significantly lower in the case group than in the control group ($p = 0.000$), corroborating partially the results of other authors (16, 17) that did not found significant differences for all the elements of the SP (16, 17). However there is a study that did not show a significant difference in ST levels between healthy subjects and those with seminal quality alterations (18). There was a statistically significant correlation (Table 2) between ST and all ele-

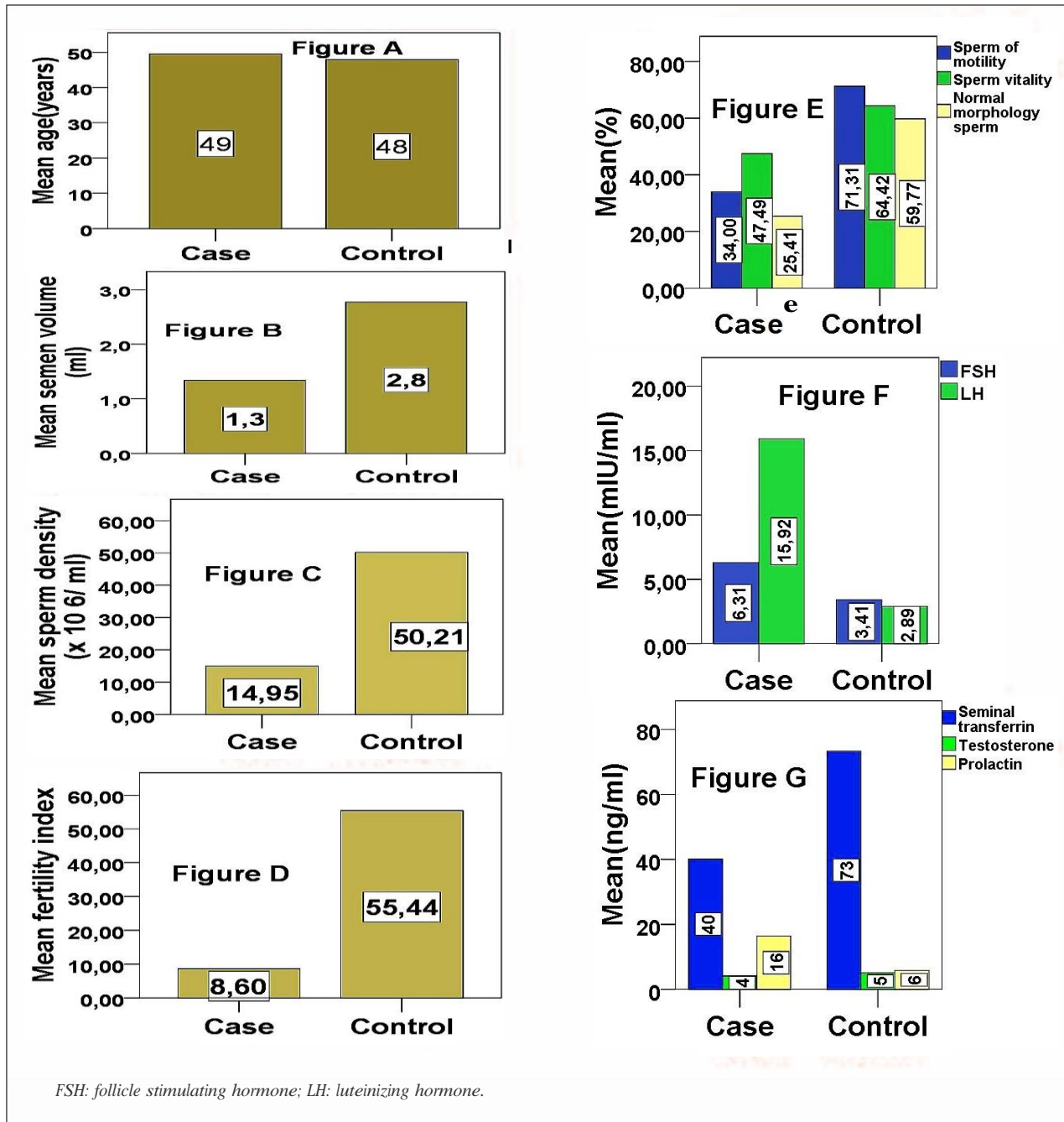


Figure 1.
Distribution of mean values of all parameters tested in the case and control groups.

ments of the SP ($p < 0.05$). However, these correlations were not linear in comparative studies with non-uremic population of other authors. *Bharshankar and Bharshankar* (13) found only a statistically significant correlation between ST and percent of motile sperms ($p < 0.05$).

Fuse et al. (8) found only a statistically significant correlation between sperm concentration and ST level ($r = 0.56$; $p < 0.05$).

The FI is a general index to evaluate the semen quality, which was better than any single semen parameter (2).

In the present study we found a FI significantly lower in the case group than in the control group (Table 1) in

according with the results of other Authors in uremic populations as *Xu et al.* (16) who found a value of 0.68 (2.08) vs 7.72 (13.51) ($p < 0.05$) and *Xu et al.* (17) who reported a value of 0.23 (0.76) vs 13.02 (14.26) ($p < 0.001$).

The positive relationship of ST with sperm concentration and fertility index in the present study can explain up to 72.2% (R^2) ($p = 0.000$) and 61.9% (R^2) ($p = 0.000$) of the cases, respectively, by the simple linear regression model. This reinforces the hypothesis of its association with SPs. The explanation for changes identified in SPa and ST level are multifactorial (19). But there is evidence of the importance of cytokines and other immune regulatory factors in

the regulation of testicular function (steroidogenesis and spermatogenesis) during pathophysiological states as well as under normal physiological conditions (20).

Cytokines are interconnected with multiple factors, including steroid hormones, the redox system, and systemic or local inflammation (15).

The HD patients are characterized by increased levels of oxidative stress and inflammation with the relationship between inflammation and oxidative stress leading to overproduction of *reactive oxygen species* (ROS) (21).

These factors are likely to represent an important component for the development of SP changes (21).

It is postulated that hypercytokinemia generated in patient HD can profoundly affect vascular testicular permeability and to achieve interstitial compartment of the testis (22). This causes directly profound changes in the physiology of the *blood-testis barrier* (BTB) and/or stimulate the testicular macrophages to produce different pro and anti-inflammatory cytokines, promoting blockage of the paracrine/autocrine testicular regulation systems (22). In the male reproductive system there is a variety of cytokines in human seminal plasma, with differences in cytokine concentrations between fertile and infertile men and negative correlations between some cytokine levels and SP (22).

The relationship between inflammation and oxidative stress is confirmed and both processes contribute with adverse effects on the structural and functional integrity of sperm, resulting in changes in the sperm function and in male infertility by protein, glycogen, lipid and DNA peroxidation that can partially justify changes in the seminal parameters (15).

Pro- and anti-inflammatory cytokines and other inflammatory mediators are largely responsible for the changes observed in seminal plasma (23). IL-6 is a multifunctional cytokine involved in many changes identified in the tubular and interstitial compartments testicular with reflection on the seminal quality (23). It has been suggested that it is a potent inhibitor of the seminiferous epithelium (23), modulating ST production by Sertoli cells (20) and inducing persistent testicular resistance to LH action and/or suppression of cell steroidogenesis in the Leydig cells (24),

On the other hand, IL-6 has other important functions which play an important role in maintaining the function of Sertoli cells, germ cells, regulating the dynamics of BTB via delaying BTB-constituent proteins degradation (22). Overexpression of IL-6 (systemic inflammation) could disrupt the integrity of the Sertoli cell and BTB, making foreign molecules to reach germ cells (22). Alteration of the permeability of BTB seems to be the most important event in the pathophysiology of changes in the semen of patients with seminal parameter changes

(22). The cytokines produced by the complex systemic inflammation/oxidative stress, frequently observed in these patients might modulate the activity of the prooxidative and antioxidative systems (25).

The oxidative stress is responsible for permanent peroxidative damage to spermatozoa by means of protein complexes called ion-responsive elements and ion regulatory proteins (ERIs/PRI) (25). These proteins are responsible for the post-transcriptional regulation of proteins linked

to uptake iron (transferrin receptor 1 -RTf1) and storage iron (ferritin) (25). When altered, they promote changes in intracellular iron ion levels and morpho-functional changes in seminal quality by toxic effect on germ cells (25). That breakdown of the intratesticular pro-and anti-inflammatory cytokine balance promoted by different cytokines as the IL-6 contributes significantly by changes in the permeability of BTB to important alterations in autocrine/paracrine autoregulation mechanisms of interaction between surrounding germ cells, Sertoli and Leydig cells (26). The changes promoted by cytokines result in an immunopathological microenvironment that can change the testicular immune privilege and justify partially the changes in ST levels and their association with seminal quality and fertility index in this group of patients.

CONCLUSION

Although the multifactoriality in etiology of sub/infertility, our results suggest that seminal quality is associated with ST levels and what ST can be used the initial investigation of subfertility/infertility of patients undergoing chronic hemodialysis with alteration in seminal quality. This study presents the limitations of the absence of supplementary measurement of total seminal antioxidant capacity and of the reduced sample.

REFERENCES

1. Organization WH. *WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen*. 2010.
2. Harvey C. A fertility index derived from semen analysis. *J Clin Pathol*. 1953; 6:232-6.
3. Franca LR, Hess RA, Dufour JM, et al. The Sertoli cell: one hundred fifty years of beauty and plasticity. *Andrology*. 2016; 4:189-212.
4. Akchurin OM, Kaskel F. Update on inflammation in chronic kidney disease. *Blood Purif*. 2015; 39:84-92.
5. Palmer BF, Clegg DJ. Gonadal dysfunction in chronic kidney disease. *Rev Endocr Metab Disord*. 2017; 18:117-130.
6. Zedan H, Kamal EE, El Shazly A, et al. Impact of renal failure and haemodialysis on semen parameters and reproductive hormones. *Human Andrology*. 2013; 3:16-20.
7. Lehtihet M, Hylander B. Semen quality in men with chronic kidney disease and its correlation with chronic kidney disease stages. *Andrologia*. 2015; 47:1103-8.
8. Fuse H, Satomi S, Okumura M, Katayama T. Seminal plasma transferrin concentration: relationship with seminal parameters and plasma hormone levels. *Urol Int*. 1992; 49:158-62.
9. Ber A, Varamon N, Yogev L, et al. Transferrin in seminal plasma and in serum of men: its correlation with sperm quality and hormonal status. *Hum Reprod*. 1990; 5:294-7.
10. Irisawa C, Nakada T, Kubota Y, et al. Transferrin concentration in seminal plasma with special reference to serum hormone levels in infertile men. *Arch Androl*. 1995; 50:15-21.
11. Meeker JD, Godfrey-Bailey L, Hauser R. Relationships between serum hormone levels and semen quality among men from an infertility clinic. *J Androl*. 2007; 28:397-406.

12. Kosar A, Sarica K, Ozdiler E. Effect of varicocelelectomy on seminal plasma transferrin values: a comparative clinical trial. *Andrologia*. 2000; 32:19-22.
13. Bharshankar RN, Bharshankar JR. Relationship of seminal plasma transferrin with seminal parameters in male infertility. *Indian J Physiol Pharmacol*. 2000; 44:456-60.
14. Saeed S, Khan FA, Rahman SB, et al. Biochemical parameters in evaluation of oligospermia. *J Pak Med Assoc*. 1994; 44:137-40.
15. Fraczek M, Kurpisz M. Cytokines in the male reproductive tract and their role in infertility disorders. *J Reprod Immunol*. 2015; 108:98-104.
16. Xu L, Xu H, Zhu X, et al. Effect of uremia on semen quality and reproductive function in humans. *Cell Biochem Biophys*. 2012; 62:29-33.
17. Xu LG, Xu HM, Zhu XF, et al. Examination of the semen quality of patients with uraemia and renal transplant recipients in comparison with a control group. *Andrologia*. 2009; 41:235-40.
18. Eneroth P, Lizana J, Bygdeman M. Lactoferrin and transferrin levels in the seminal plasma of infertile men. *Protides of the Biological Fluids*. 1984; 31:149-53.
19. Coutton C, Fissore RA, Palermo GD, et al. Male Infertility: Genetics, Mechanism, and Therapies. *Biomed Res Int*. 2016; 2016:7372362.
20. Guazzone VA, Jacobo P, Theas MS, Lustig L. Cytokines and chemokines in testicular inflammation: A brief review. *Microsc Res Tech*. 2009; 72:620-8.
21. Tucker PS, Scanlan AT, Dalbo VI. Chronic kidney disease influences multiple systems: describing the relationship between oxidative stress, inflammation, kidney damage, and concomitant disease. *Oxid Med Cell Longev*. 2015; 2015:806358.
22. Zhang H, Yin Y, Wang G, et al. Interleukin-6 disrupts blood-testis barrier through inhibiting protein degradation or activating phosphorylated ERK in Sertoli cells. *Sci Rep*. 2014; 4:4260
23. Salman DTA-WD. Evaluation the effect of Interleukin-6 and Tumor Necrosis Factor in semen quality of infertile men with varicocele. *Kufa Journal for Nursing Sciences | مجلة الكوفة للعلوم التمريضية*. 6 ;2016.
24. Tremblay JJ. Molecular regulation of steroidogenesis in endocrine Leydig cells. *Steroids*. 2015; 103:3-10.
25. Zhao S, Zhu W, Xue S, Han D. Testicular defense systems: immune privilege and innate immunity. *Cell Mol Immunol*. 2014; 11:428-37.
26. Fijak M, Bhushan S, Meinhardt A. *The Immune Privilege of the Testis*. *Immune Infertility*: Springer; 2017; p. 97-107.

Correspondence

Gilmar Pereira Silva (Corresponding Author)
gilpsilva2006@gmail.com
Urologist physician PhD, University of Brasilia
North Hotel Sector, Block D, Apartment 1716, Fusion Building,
70701- 040 Brasilia, Federal District, Brazil

Fabiana Pirani Carneiro
fabianapirani@hotmail.com
Professor PhD, Faculty of Medicine of the University of Brasilia
Brasilia, Federal District, Brazil

Vitor Pereira Xavier Grangeiro
vitorpxavierg10@gmail.com
Academic of the Faculty of Medical Sciences
João Pessoa, Paraiba, Brazil

APÊNDICE C – ARTIGO III



Systemic Inflammation and Seminal Parameters in Chronic Hemodialysis Patients

Gilmar Pereira Silva,^{1,*} Fabiana Pirani Carneiro,² and Vitor Pereira Xavier Grangeiro³

¹Urologist MD of the University of Brasilia, Brasilia, Federal District, Brazil

²Professor PhD at the University of Brasilia, Brasilia, Federal District, Brazil

³Academic of the Faculty of Medical Sciences, Joao Pessoa, Paraiba, Brazil

*Corresponding author: Gilmar Pereira Silva, Hotel Sector North, Block D, Apartment 1716, Fusion Building, Brasilia, Federal District, Brazil. Tel/Fax: +61-30517400 R-1716, E-mail: gilpsilva2006@gmail.com

Received 2017 August 15; Accepted 2017 November 05.

Abstract

Objectives: We proposed to investigate the possible effect and association of systemic inflammation (SI) and seminal parameter indicators in chronic hemodialysis patients.

Methods: This was a cross-sectional study. All the participants were subjected to a spermiogram with calculation of fertility index (FI), serum C-reactive protein (CRP) level, seminal transferrin (ST) level, as well as evaluation of the hormonal profile (HP). The sample consisting of 60 men (cases) undergoing hemodialysis for more than 6 months was subdivided into 3 groups: group 1 (n = 30, with inflammation, CRP > 5 mg/L), group 2 (n = 30, without inflammation, CRP ≤ 5 mg/L), and group 3 (n = 30, healthy men, CRP ≤ 1).

Results: Age was similar in the 3 groups (P = 0.43). FI, testosterone total and ST levels were significantly lower in the case groups than in the control group (P < 0.001). Follicle stimulating hormone, luteinizing hormone, and prolactin levels were significantly higher in the case groups than in the control group (P < 0.001). Between the subgroups of cases (groups 1 and 2), the inflammatory factor alone does not seem to interfere with the FI, HP, and ST level (P > 0.05). However, it significantly interfered with the FI, HP, and ST level when compared between the case groups and the control group (P < 0.001). No correlation was observed between SI and analyzed parameters (P > 0.05).

Conclusions: The results suggest that the SI alone has no effect and is not associated with the FI or ST level in a patient undergoing chronic hemodialysis.

Keywords: Chronic Kidney Disease, Hemodialysis, Seminal Parameter, Male Infertility, Seminal Transferrin and Systemic Chronic Inflammation, Fertility Index, Seminal Quality

1. Background

Systemic chronic inflammation (SCI) is a basic feature of chronic kidney disease (CKD)/end-stage renal disease (ESRD), especially in those undergoing hemodialysis (HD), and is related to genetics, uremia, dialysis, oxidative stress, and inflammatory factors (1). SCI is the result of the increased serum levels of proinflammatory cytokines such as interleukin (IL)-6 and tumor necrosis factor (TNF- α) as well as acute phase proteins such as C-reactive protein (CRP) and fibrinogen (1). It has now been well established that CKD/ESRD is a type of SCI (2).

Patients with CKD, especially HD, frequently present with subfertility/infertility, are characterized by poor seminal quality (3). The etiology of subfertility/infertility in these patients and in the general population is multifactorial, involving genetic, hormonal, immunological, oxidative, and inflammatory factors (4).

Subfertility/infertility in the male population is a clinical condition that affects approximately 15% of couples of childbearing age, with 50% of the masculine factor being manifested by changes either in sperm quality (concentration, motility, morphology, and sperm vitality) or in seminal plasma (5).

It has been reported that infection/inflammation of the genital tract increased cytokine level in seminal plasma and low quality of seminal parameters leads to subfertility/infertility (6).

However, the effect of SCI on the genital tract is poorly studied, especially in patients with CKD undergoing HD; around 40% - 60% of whom suffer from SCI (1). We decided to investigate the possible effect and association of SCI using 2 seminal parameter indicators: fertility index (FI) and seminal transferrin (ST), in HD patients.

2. Methods

2.1. Recruitment, Inclusion and Exclusion

The prospective study of prevalence was realized in the hemodialysis sector of the University hospital of the University of Brasilia, between July 2016 and December 2016, after approval by the research ethics committee of the faculty of health sciences of the University of Brasilia under number 53172316.9.0000.0030. The inclusion criteria were: age between 18 to 60 years, has been in HD for more than 6 months (cases), and absence of acute or chronic liver disease. The exclusion criteria included the presence of hemochromatosis or diseases of iron metabolism. Patients with hypogonadism and clinical conditions that could alter ST levels such as recent history of genitourinary tract infection, clinical signs of acute or chronic infection/inflammation, positive serology for hepatitis B, C, and human immunodeficiency virus (HIV), vascular access infection, leukocytosis, fever, as well as hypoproteinemia were not included in the study. All the participants were subjected to a spermogram with calculation of FI, serum CRP level, and ST level, as well as an evaluation of the hormonal profile (HP) (follicle stimulating hormone-FSH; luteinizing hormone - LH, total testosterone - TT and prolactin - PRL. The sample consisting of 60 men (cases) in high flow HD by vascular fistula access, 3x week with duration of 4 hours / HD session, was subdivided into group 1 (n = 30, with inflammation, CRP > 5 mg/L) and group 2 (n = 30, without inflammation, CRP ≤ 5 mg/L) as it is suggested by clinical practice guidelines and clinical practice recommendations for anemia in chronic kidney disease (7) as well as 30 healthy men (control) with lower cardiovascular risk (8) (CRP ≤ 1 mg/L) from the health promotion outpatient clinic of the same hospital with renal function (glomerular filtration rate > than 90 mL/min per 1.73 m²), sperm without changes.

2.2. Routine Collection of Blood and Semen

The blood sample for analysis was collected from the arteriovenous fistula immediately before the first weekly hemodialysis session in the case group and on a previously scheduled day for the control group, always between 8:00 and 10:00 a.m. in the clinical laboratory of the same hospital to assay ST, FSH, LH, TT, and PRL. On the same day of blood collection, the semen was collected by voluntary masturbation in an appropriate environment at ambient temperature to perform spermogram by manual method according to the guidelines of the world health organization (WHO) laboratory manual for the examination and processing of human semen 5th ed (9). The seminal plasma preparation was centrifuging at 3500 × g for 20 minutes after 30 minutes liquefaction. The supernatant

was collected into a new tube and held at -20°C for the measurement of ST levels. ST and hormones belonging to the hormonal profile were measured by enzyme immunochemiluminescence using the Immulite 2000 / Siemens automatic analyzer. Specific kits were used for quantification, as well as calibrators and controls recommended by the manufacturer.

2.3. Fertility Index (FI)

FI was calculated according to Harvey (10) as follows: FI = sperm concentration (× 10⁶/mL) × sperm motility × percentage of spermatozoa with normal morphology.

2.4. Statistical Analysis

After the normal distribution curve of the sample was verified by normality tests (Shapiro-Wilk), the one-way ANOVA test followed by the Bonferroni test was used for differences between 3 independent quantitative variables. To verify correlation between 2 independent quantitative variables Pearson correlation analysis was. Statistical significance was set at P < 0.05 to reject the null hypothesis. SPSS® for Windows, version 20.0 was used.

3. Results

The age was similar in the 3 groups (49.83 ± 5.65; 49.10 ± 5.54 and 47.90 ± 6.22, P = 0.43). FI, TT, and ST factors were significantly lower in the case groups than in the control group. Although there is no clinical hypogonadism (testosterone level was within normal range) in the sample population, FSH, LH, and PRL, levels were significantly higher in the cases than in the controls (P < 0.001) (Table 1). The inflammatory factor, analyzed alone, did not seem to interfere with the FI, HP, and ST level between the subgroups of cases (groups 1 and 2, P > 0.05). However, it significantly interfered with the FI, HP, and ST level between the case groups and the control group (Table 1, P < 0.001). No correlation was observed between the analyzed parameters and SCI (Table 2, P > 0.05).

4. Discussion

To our knowledge, the present study is the first to investigate the effect of SCI on 2 indicators of seminal parameters: ST and FI, in HD patients. These indicators can be useful in the initial evaluation of semen quality in patients with suspected subfertility/infertility, considering the ease and low cost at which sperm quality and seminal transferin level can be tested.

The similar age of the groups (P = 0.430, Table 1) and the eugonadism of the sample population studied reduce

Table 1. Comparative evaluation of age, fertility index, hormone profile and transferrin seminal level among groups ($x \pm SD$), (N = 30)

Observed Parameters	Group 1	Group 2	Group 3	P ^a Values	Bonferroni' Test		
					Group 1 and Group 2	Group 1 and Group 3	Group 2 and Group 3
Age, y	49.83 \pm 5.65	49.10 \pm 5.54	47.90 \pm 6.22	0.430			
Fertility index ^b	0.66 (0.33)	1.05 (1.3)	5.54 (1.3)	00.000	00.29	00.000	00.000
FSH, mIU/mL	06.4 \pm 01.39	06.18 \pm 01.00	03.40 \pm 00.48	00.000	01.00	00.000	00.000
LH, mIU/mL	06.01 \pm 01.67	15.81 \pm 02.61	02.84 \pm 00.54	00.000	01.00	00.000	00.000
Testosterone, ng/dL	399.73 \pm 48.99	422.33 \pm 66.24	510.60 \pm 92.56	00.000	01.00	00.000	00.000
Prolactin, ng/mL	16.24 \pm 2.98	16.52 \pm 02.91	05.86 \pm 01.93	00.000	01.00	00.000	00.000
Transferrin seminal, ng/mL	37.90 \pm 06.22	42.35 \pm 09.46	73.32 \pm 06.81	00.000	00.07	0.000	0.000

Abbreviations: FSH, Follicle-Stimulating Hormone; LH, Luteinizing Hormone.

^a One-way anovast.^b Fertility index (FI) = sperm density (0.10^6 mL^{-1}) \times sperm motility \times sperm morphology (this value represents the number of sperm with forward motile and normal morphology in each mL), as described by Harvey (1953).**Table 2.** Correlational Evaluation Pearson of C-Reactive Protein with Seminal Transferrin and Fertility Index in Group Case

Observed Parameters	Group Case (N = 60)	
	r	P Value
C-reactive protein		
Seminal transferrin	-0.166	0.204
Fertility index	-0.238	0.067

bias and confer reliability to the results. The sex hormones are important for seminal quality, as adequate spermatogenesis and seminal transferrin synthesis in the testicular gland, both of which are associated with seminal quality, require these hormones (11).

The HP identified in HD patients is often characterized by elevated serum levels of FSH, LH, and PRL, as well as low testosterone (hypogonadism) in approximately 1/3 of HD patients caused by blockages at one or more sites along the hypothalamic-pituitary-testicular (HPT) axis (12, 13).

Testicular level is due to dysfunction of Leydig cells because of pro-inflammatory cytokines, such as TNF- α , IL-1, and interleukin 6 (IL-6), which inhibit testicular Leydig cell steroidogenesis at the level of gene expression of different steroidogenic enzymes induced by CKD and HD (14), LH reduced clearance, as well as hyperprolactinemia caused by reduced clearance of PRL (12).

The sexual hormones (Table 1) in the case group in our study partially followed the pattern described above this is: high levels of FSH and LH, but TT levels within the limits of normality (eugonadics). Absence of clinical hypogonadism, in thesis, withdraw the hormonal factor in the pathophysiology of the changes found in the ST level and seminal parameter.

The FI and ST level are indicators frequently used in studies on patients suspected of suffering from subfertil-

ity/infertility caused by seminal parameter change (15).

The FIs were significantly lower in the case subgroups than in the control group: 0.66 (0.33) (group 1) and 1.05 (1.3) (group 2) vs. 5.54 (1.3) (group 3), $P < 0.001$. Xu et al. (16) found similar results in a uremic population: 0.68 (2.08) for case and 7.7 (13.51) for control.

ST levels were significantly lower in the case subgroups than in the control group 37.90 \pm 06.22 ng/mL (group 1) and 42.35 \pm 09.46 ng/mL (group 2) vs. 73.32 \pm 06.81 ng/mL (group 3), $P < 0.001$. This finding has been corroborated by a study by Bharshankar and Bharshankar (17), who found that mean seminal plasma transferrin concentration in fertile men was 5.35 \pm 2.07 mg/dL and that in normozoospermic subject was 4.63 \pm 2.50 mg/dL, which was significantly higher ($P < 0.001$) than that in oligozoospermic, azoospermic, and post-vasectomized subjects. The reasons for which ST levels are lower in patients with poor seminal quality are unknown, however, it is hypothesized that it is because IL-6 reduces transferrin secretion by the Sertoli cells of the testes (18).

The reduction in seminal quality found in patients undergoing HD and reflected in the FI and ST levels analyzed in this study is multifactorial (prevalence of uremia and hormonal, immunological, oxidative, and inflammatory factors) (19).

It is an established fact that inflammation/infection of the male urogenital tract reduces seminal quality due to an increase in the levels of seminal cytokines (18).

The effect of chronic systemic inflammation as a modifying factor of seminal parameter is little studied. After the contribution of uremic factor in the lowering of seminal quality in patients with renal failure was recognized (16, 20), the contribution of the oxidative/inflammatory factors was emphasized (21, 22). Patients undergoing hemodialysis can be characterized by increased levels of oxidative stress and inflammation (23). The relation of inflammation and oxidative stress to overproduction of reac-

tive oxygen species (ROS) in HD is well known (24). This relation is attributed to the ability of ROS to activate nuclear factors such as nuclear factor kappa B (NF- κ B), which is an inducer of the synthesis of pro-inflammatory cytokines such as IL-6 and TNF- α , and the consequent elevation of acute phase proteins such as fibrinogen and CRP (24). In addition to being an inflammation inducer (24), ROS have an important direct contribution to the seminal parameter changes, promoting substantial adverse effects on the structural and functional integrity of sperms by protein, glycogen, lipid, and DNA peroxidation (25). They can therefore be considered partially responsible for defective morphology and function of the sperms of male patients with subfertility/infertility (25).

As SCI is almost always present in patients undergoing HD (1), it is plausible to postulate that hypercytokinemia induced in such patients can profoundly affect vascular testicular permeability and can reach the interstitial compartment of the testis (26). Hypercytokinemia, which is a part chronic inflammation in HD patients, modulates interactions among immunological, oxidative, and inflammatory mediators, which are responsible for sperm dysfunction (18). This would cause profound and direct changes in the physiology of the hematotesticular barrier, stimulate the testicular macrophages to produce different pro and anti-inflammatory cytokines, destroy the local paracrine/autocrine systems, as well as other mechanisms, which are responsible for maintaining the immune privileged condition of the testes (26, 27).

Thus, we cannot affirm that neither the significant differences (FI, PH, and ST) found between the case groups and the control group ($P < 0.001$), nor the absence of effect of the inflammatory factor on FI, PH, and ST in the subgroups of cases (groups 1 and 2) ($P > 0.05$) were due solely to the inflammatory factor analyzed. The absence of correlation of the inflammatory factor with FI and ST (Table 2) may reinforce the multifactorial etiology of the seminal alterations found among the groups. This study has 2 limitations: the lack of measurement of total seminal antioxidant capacity and a small sample size. The results suggest that the inflammatory factor alone has no effect and is not associated with the fertility index or seminal transferrin level in a patient undergoing chronic hemodialysis.

Footnotes

Authors' Contribution: Gilmar Pereira Silva and Fabiana Pirani Carneiro, equal contributors. Gilmar Pereira Silva drafted the manuscript. Fabiana Pirani Carneiro and Vitor Pereira Xavier Grangeiro critically reviewed it and make addition. All authors declared the final version of manuscript.

Competing Interests: The authors declare that they have no competing interests.

Ethical Approval: Approved by the research ethics committee of the faculty of health Sciences of the University of Brasilia under number 53172316.9.0000.0030.

Informed Consent: Informed consent was obtained from all individual participants included in the study.

References

1. Akchurin OM, Kaskel F. Update on inflammation in chronic kidney disease. *Blood Purif*. 2015;39(1-3):84–92. doi: 10.1159/000368940. [PubMed: 25662331].
2. Yilmaz MI, Carrero JJ, Axelsson J, Lindholm B, Stenvinkel P. Low-grade inflammation in chronic kidney disease patients before the start of renal replacement therapy: sources and consequences. *Clin Nephrol*. 2007;68(1):1–9. doi: 10.5414/CNP68001. [PubMed: 17703829].
3. Palmer BF, Clegg DJ. Gonadal dysfunction in chronic kidney disease. *Rev Endocr Metab Disord*. 2017;18(1):117–30. doi: 10.1007/s11154-016-9385-9. [PubMed: 27586847].
4. Ventimiglia E, Montorsi F, Salonia A. Comorbidities and male infertility: a worrisome picture. *Curr Opin Urol*. 2016;26(2):146–51. doi: 10.1097/MOU.0000000000000259. [PubMed: 26765042].
5. Coutton C, Fissore RA, Palermo GD, Stouffs K, Toure A. Male Infertility: Genetics, Mechanism, and Therapies. *Biomed Res Int*. 2016;2016:7372362. doi: 10.1155/2016/7372362. [PubMed: 26942199].
6. Azenabor A, Ekun AO, Akinloye O. Impact of Inflammation on Male Reproductive Tract. *J Reprod Infertil*. 2015;16(3):123–9. [PubMed: 26913230].
7. National Kidney F.Kdoqi. KDOQI Clinical Practice Guidelines and Clinical Practice Recommendations for Anemia in Chronic Kidney Disease. *Am J Kidney Dis*. 2006;47(5 Suppl 3):S11–145. doi: 10.1053/j.ajkd.2006.03.010. [PubMed: 16678659].
8. Willerson JT, Ridker PM. Inflammation as a cardiovascular risk factor. *Circulation*. 2004;109(21 Suppl 1):II2–10. doi: 10.1161/01.CIR.0000129535.04194.38. [PubMed: 15173056].
9. World Health Organization. *WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen*. 2010.
10. Harvey C. A fertility index derived from semen analysis. *J Clin Pathol*. 1953;6(3):232–6. doi: 10.1136/jcp.6.3.232. [PubMed: 13084771].
11. Ramaswamy S, Weinbauer GF. Endocrine control of spermatogenesis: Role of FSH and LH/testosterone. *Spermatogenesis*. 2014;4(2):e996025. doi: 10.1080/21565562.2014.996025. [PubMed: 26413400].
12. Lo JC, Beck GJ, Kaysen GA, Chan CT, Kligler AS, Rocco MV, et al. Hyperprolactinemia in end-stage renal disease and effects of frequent hemodialysis. *Hemodial Int*. 2017;21(2):190–6. doi: 10.1111/hdi.12489. [PubMed: 27774730].
13. Grossmann M, Hoermann R, Ng Tang Fui M, Zajac JD, Ierino FL, Roberts MA. Sex steroids levels in chronic kidney disease and kidney transplant recipients: associations with disease severity and prediction of mortality. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2015;82(5):767–75. doi: 10.1111/cen.12656. [PubMed: 25378236].
14. Tremblay JJ. Molecular regulation of steroidogenesis in endocrine Leydig cells. *Steroids*. 2015;103:3–10. doi: 10.1016/j.steroids.2015.08.001. [PubMed: 26254606].
15. Boe-Hansen GB, Rego JP, Crisp JM, Moura AA, Nouwens AS, Li Y, et al. Seminal plasma proteins and their relationship with percentage of morphologically normal sperm in 2-year-old Brahman (*Bos indicus*) bulls. *Anim Reprod Sci*. 2015;162:20–30. doi: 10.1016/j.anireprosci.2015.09.003. [PubMed: 26417650].

16. Xu L, Xu H, Zhu X, Zhang J, Ma M, Shi X. Effect of uremia on semen quality and reproductive function in humans. *Cell Biochem Biophys*. 2012;**62**(1):29–33. doi: [10.1007/s12013-011-9254-9](https://doi.org/10.1007/s12013-011-9254-9). [PubMed: [21826526](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21826526/)].
17. Bharshankar RN, Bharshankar JR. Relationship of seminal plasma transferrin with seminal parameters in male infertility. *Indian J Physiol Pharmacol*. 2000;**44**(4):456–60. [PubMed: [11214501](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11214501/)].
18. Fraczek M, Kurpisz M. Cytokines in the male reproductive tract and their role in infertility disorders. *J Reprod Immunol*. 2015;**108**:98–104. doi: [10.1016/j.jri.2015.02.001](https://doi.org/10.1016/j.jri.2015.02.001). [PubMed: [25796532](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25796532/)].
19. Dohle G. *Clinical Uro-Andrology*. Springer; 2015. Male factors in couple's infertility; p. 197–201.
20. Lehtihet M, Hylander B. Semen quality in men with chronic kidney disease and its correlation with chronic kidney disease stages. *Andrologia*. 2015;**47**(10):1103–8. doi: [10.1111/and.12388](https://doi.org/10.1111/and.12388). [PubMed: [25487067](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25487067/)].
21. Cachofeiro V, Goicochea M, de Vinuesa SG, Oubina P, Lahera V, Luno J. Oxidative stress and inflammation, a link between chronic kidney disease and cardiovascular disease. *Kidney Int Suppl*. 2008;(111):S4–9. doi: [10.1038/ki.2008.516](https://doi.org/10.1038/ki.2008.516). [PubMed: [19034325](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19034325/)].
22. Aitken RJ. Oxidative stress and the etiology of male infertility. *J Assist Reprod Genet*. 2016;**33**(12):1691–2. doi: [10.1007/s10815-016-0791-4](https://doi.org/10.1007/s10815-016-0791-4). [PubMed: [27544275](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27544275/)].
23. Haggmann H, Brinkkoetter PT. ROS and oxidative stress in CKD patients: is it the mitochondria that keeps CKD patients in bed?. *Nephrol Dial Transplant*. 2015;**30**(6):867–8. doi: [10.1093/ndt/gfv052](https://doi.org/10.1093/ndt/gfv052). [PubMed: [25735768](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25735768/)].
24. Tucker PS, Scanlan AT, Dalbo VJ. Chronic kidney disease influences multiple systems: describing the relationship between oxidative stress, inflammation, kidney damage, and concomitant disease. *Oxid Med Cell Longev*. 2015;**2015**:806358. doi: [10.1155/2015/806358](https://doi.org/10.1155/2015/806358). [PubMed: [25861414](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25861414/)].
25. Asadi N, Bahmani M, Kheradmand A, Rafieian-Kopaei M. The Impact of Oxidative Stress on Testicular Function and the Role of Antioxidants in Improving it: A Review. *J Clin Diagn Res*. 2017;**11**(5):IE01–5. doi: [10.7860/JCDR/2017/23927.9886](https://doi.org/10.7860/JCDR/2017/23927.9886). [PubMed: [28658802](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28658802/)].
26. Zhang H, Yin Y, Wang G, Liu Z, Liu L, Sun F. Interleukin-6 disrupts blood-testis barrier through inhibiting protein degradation or activating phosphorylated ERK in Sertoli cells. *Sci Rep*. 2014;**4**:4260. doi: [10.1038/srep04260](https://doi.org/10.1038/srep04260). [PubMed: [24584780](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24584780/)].
27. Chen H, Mruk D, Xiao X, Cheng CY. *Male Hypogonadism*. Springer; 2017. Human Spermatogenesis and Its Regulation; p. 49–72. doi: [10.1007/978-3-319-53298-1_3](https://doi.org/10.1007/978-3-319-53298-1_3).