

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA

**Saúde Reprodutiva da População  
Masculina Portuguesa – estudo de  
uma amostra populacional de  
dadores de gâmetas**

Ana Catarina Silva Fonseca

**M**

2019



# **Saúde Reprodutiva da População Masculina Portuguesa – estudo de uma amostra populacional de dadores de gâmetas**

Ana Catarina Silva Fonseca

up200706598@icbas.up.pt

Dissertação de Mestrado Integrado em Medicina

Apresentada ao Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto

## **Orientador**

Dr. Emídio André do Vale Fernandes

Assistente Hospitalar de Ginecologia/Obstetrícia do Centro Hospitalar Universitário do Porto, EPE

## **Coorientador**

Prof. Doutor António Tomé da Costa Pereira

Assistente Graduado Sénior de Ginecologia/Obstetrícia do Centro Hospitalar Universitário do Porto, EPE

Professor Catedrático Convidado do Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto

Junho, 2019

Ana Catarina Silva Fonseca

---

Ana Catarina Silva Fonseca

Emílio Vale Fernandes

---

Dr. Emídio Vale Fernandes

Prof. Doutor António Tomé Pereira

---

Prof. Doutor António Tomé Pereira

*Life is not easy for any of us. But what of that? We must have perseverance and above all confidence in ourselves. We must believe that we are gifted for something and that this thing must be attained. **Marie Curie***

# Agradecimentos

Antes de mais, tenho a agradecer aos meus pais por todo o amor, carinho e apoio incondicional. Foi graças a vocês que me “atirei de cabeça” para um segundo curso. Obrigada por nunca deixarem de acreditar em mim e não deixarem que eu parasse de acreditar em mim mesma. Se consegui chegar tão longe foi graças a vocês. Queria também agradecer ao resto da minha família, em especial ao meu avô, à minha madrinha e ao meu tio por me terem sempre encorajado, mesmo nos momentos mais difíceis.

Quero agradecer ao Dr. Emídio Vale Fernandes por ter acreditado em mim e nas minhas capacidades. Agradeço ainda toda a paciência, orientação e ensinamentos ao longo deste projecto. O meu muito obrigada.

Ao Prof. Doutor António Tomé, um agradecimento pela coorientação deste trabalho, tornando possível a sua execução e apresentação.

Devo ainda um agradecimento especial ao Prof. Rui Magalhães, por todo o tempo dispensado a ajudar-me com a análise estatística.

Quero agradecer às minhas amigas Marta Pereira, Inês Cardoso, Marta Machado, e em especial à Inês Pacheco, à Patrícia Araújo e ao Tiago Beirão, por toda a paciência, desabafos e amizade ao longo desta jornada.

À Joana Paes de Faria, Ana Seixas e Maria Azevedo, obrigada por toda a cumplicidade e apoio ao longo destes anos. Se “os amigos são a família que escolhemos”, então eu escolhi a melhor!

Por último, um especial obrigada aos meus amigos bioengenheiros, em particular à Andreia Silva, à Sofia Santos, ao Diogo Mosqueira e ao Nuno Leitão, que no meio de muitas gargalhadas e disparates, sempre se prontificaram para me ajudar das mais diversas formas.

# Resumo

Cada indivíduo tem o direito a uma vida sexual e reprodutiva satisfatória e segura. Nesse sentido, há um empenho cada vez maior por parte de vários países, incluindo Portugal, no sentido de fazer chegar os cuidados de Saúde Reprodutiva à sua população. Contudo, existem escassos dados relativos ao estudo de amostras populacionais e ao resultado das intervenções implementadas no nosso país.

Neste trabalho, propomo-nos estudar o estado actual de saúde reprodutiva da população portuguesa, utilizando como amostra os candidatos a dadores de gâmetas masculinos constantes no Banco Público de Gâmetas, inscritos entre 2011 e 2018.

Trata-se de um estudo nunca antes realizado na nossa população e que permitiu concluir que, na amostra estudada, tem havido uma diminuição da qualidade espermática ao longo dos últimos 9 anos e que a motilidade progressiva dos espermatozoides está negativamente associada com o aumento do índice de massa corporal. Identificou-se ainda uma relação entre o consumo de drogas e a diminuição do pH do ejaculado.

# Abstract

Each individual has the right to have a safe and satisfactory sexual and reproductive life. Therefore, several countries have made an effort to make Reproductive Health available to their population, including Portugal. However, there are few data about populational studies and the results of the implemented policies in our country.

In this work, we propose to study the current reproductive health status of the portuguese population, by using as sample the sperm donors candidates from the Portuguese Public Gametes Bank, registered from 2011 to 2018.

This is the first time that a study like this is realized in our population, and it allowed us to conclude that in our sample there has been a decrease in sperm quality throughout the last 9 years, and that spermatozoa progressive motility is inversely associated with the increase of the body mass index. We also identified an association between drug use and the decrease of sperm pH.

# Lista de Abreviaturas

BPG – Banco Público de Gâmetas

CHUP – Centro Hospitalar Universitário do Porto

CNPMA – Conselho Nacional de Procriação Medicamente Assistida

DGS – Direcção-Geral da Saúde

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

FSH – Hormona Folículo-estimulante

GnRH – Hormona Libertadora de Gonadotrofinas

hCG – Gonadotrofina Coriónica Humana

HHG – Hipotálamo-Hipófise-Gónada

HIV – Vírus da Imunodeficiência Humana

HTLV – Vírus linfotrópico das células T humanas

IAS – Indexante de Apoios Sociais

ICSI – Injeção intracitoplasmática de espermatozoides

IMC – Índice de Massa Corporal

LH – Hormona Luteinizante

PMA - Procriação Medicamente Assistida

REM – Rapid Eye Movement

WHO – World Health Organization



# Índice

Índice de Tabelas.....	vi
Índice de Figuras .....	vii
Introdução.....	1
Saúde Sexual e Reprodutiva e a epidemiologia da infertilidade.....	1
Fisiologia reprodutiva masculina .....	3
Factores que afectam a qualidade espermática .....	7
Bancos de Gâmetas.....	11
Banco Público de Gâmetas Português .....	13
Avaliação e seleção dos candidatos a dadores .....	14
Objectivos.....	17
Material e Métodos.....	18
Colheita dos dados .....	18
Análise estatística.....	18
Resultados .....	20
Descrição sociodemográfica .....	20
Avaliação do espermograma da amostra de candidatos a dadores .....	22
Relação entre os valores do espermograma e os factores sociodemográficos e os factores de risco .....	24
Efeito dos factores sociodemográficos e dos factores de risco nos parâmetros do espermograma .....	28
Avaliação dos indivíduos com espermogramas anormais .....	29
Discussão.....	32
Apêndices .....	41
Apêndice 1 – Avaliação ANOVA dos efeitos dos factores sociodemográficos e dos factores de risco nos parâmetros do espermograma .....	42
Apêndice 2 – Avaliação ANOVA dos indivíduos com espermogramas anormais .....	48
Bibliografia .....	53

# Índice de Tabelas

Tabela I - Critérios de exclusão de candidatos a dadores .....	14
Tabela II - Valores seminais de aceitação para espermograma principal .....	15
Tabela III - Valores seminais de referência para a população, de acordo com a WHO .....	16
Tabela IV - Descrição sociodemográfica da amostra de candidatos a dadores de gâmetas .....	21
Tabela V - Avaliação do espermograma principal da amostra de dadores.....	22
Tabela VI - Comparação dos valores médios de cada parâmetro do espermograma tendo em conta os factores sociodemográficos.....	24
Tabela VII - Comparação dos valores médios de cada parâmetro do espermograma tendo em conta o consumo de tabaco, álcool e drogas.....	27
Tabela VIII - Influência do número de cigarros consumidos sobre cada um dos parâmetros do espermograma, na amostra total de dadores .....	29
Tabela IX - Percentagem de indivíduos com alterações em cada parâmetro do espermograma .....	30
Tabela X - Influência do número de cigarros consumidos sobre cada um dos parâmetros do espermograma, nos dadores com pelo menos um parâmetro anormal .....	31

# Índice de Figuras

Figura 1 - Distribuição mundial dos casos de infertilidade atribuídos a factor masculino (adaptado de Agarwal <i>et al.</i> , 2015).....	2
Figura 2 - Prevalência de infertilidade primária em mulheres, a nível mundial, em 2010 (adaptado de Mascarenhas <i>et al.</i> , 2012) .....	3
Figura 3 - Eixo Hipotálamo-Hipófise-Gónada (adaptado de Ing <i>et al.</i> , 2018) .....	4
Figura 4 - Espermatogénese (ES - especialização ectoplásmica; AdC - compartimento adluminal; BTB – barreira sangue-testículo; BsC - compartimento basal; BM – membrana basal) (adaptado de Nishimura <i>et al.</i> , 2017).....	5
Figura 5 - Fertilização (adaptado de Schoenwolf <i>et al.</i> , 2014).....	6
Figura 6 - Factores condicionantes de infertilidade.....	7
Figura 7 - Evolução da Concentração de espermatozoides no ejaculado ao longo dos anos; *p<0,05.....	23
Figura 8 - Evolução da Morfologia Normal dos espermatozoides ao longo dos anos; *p<0,05 .	23
Figura 9 - Valores médios de Morfologia Normal em função da idade e da Motilidade Progressiva em função do IMC; *p<0,05 .....	25
Figura 10 – Valor médio de leucócitos presentes no ejaculado em função do consumo de tabaco; *p<0,05.....	26
Figura 11 - Efeito do consumo de drogas no pH da amostra; **p<0,01.....	28
Figura 12 - Distribuição dos indivíduos de acordo com a avaliação do spermograma.....	29
Figura 13 - Número de parâmetros fora dos valores de normalidade, considerando os indivíduos não normozoospermicos .....	30
Figura 14 - Efeito da idade na morfologia normal, nos indivíduos não normozoospermicos; **p<0,01.....	31

# Introdução

## Saúde Sexual e Reprodutiva e a epidemiologia da infertilidade

O conceito de Saúde Sexual e Reprodutiva foi introduzido em 1994 na Conferência Internacional sobre População e Desenvolvimento, englobando o direito a uma vida sexual satisfatória e segura, bem como o direito de decidir se, quando e com que frequência um indivíduo deseja ter filhos<sup>1-3</sup>. Estas questões são do foro do Planeamento Familiar, que se dedica não só à informação, prevenção e diagnóstico de infeções sexualmente transmissíveis que poderão afetar a fertilidade do indivíduo, como também ao planeamento do número de filhos desejados, quer a título individual ou enquanto casal. Faz ainda parte das atividades a desenvolver no âmbito do Planeamento Familiar a identificação e orientação de casais com problemas de fertilidade<sup>1</sup>.

De acordo com a Organização Mundial de Saúde, a infertilidade é uma doença do sistema reprodutivo definida pela incapacidade de engravidar ao fim de 12 meses de relações sexuais frequentes e desprotegidas<sup>4,5</sup>. Esta pode ser subdividida em *infertilidade primária* e *infertilidade secundária*. Se o casal nunca foi capaz de gerar uma gravidez trata-se de uma *infertilidade primária*. Contudo, se o casal já tiver tido pelo menos uma gravidez, mas não conseguir actualmente gerar uma nova gravidez, considera-se uma *infertilidade secundária*. Entre 8 a 12% dos casais a nível mundial sofrem de infertilidade<sup>5</sup>. Actualmente, tem-se enquadrado a incapacidade biológica de reprodução dos indivíduos sem parceiro(a) ou casais de indivíduos do mesmo género em programas de Procriação Medicamente Assistida (PMA). De acordo com a lei portuguesa, por exemplo, além dos casais heterossexuais com infertilidade, também casais de mulheres e mulheres solteiras, independentemente do diagnóstico de infertilidade, podem recorrer a técnicas de PMA, com a utilização de espermatozoides de dador<sup>6</sup>.

As causas de infertilidade podem ser femininas, masculinas, de etiologia mista ou idiopática<sup>7</sup>, e devem-se a factores como a idade, a exposição a toxinas, drogas ou radiação, a existência de patologia, entre outros, embora a contribuição real de cada um dos factores para a redução da fertilidade não seja ainda clara<sup>8</sup>. Contudo, o fardo da infertilidade ainda é muitas vezes depositado na mulher, quer por razões sociais como biológicas<sup>3</sup>. Tal é visível na própria investigação da causa da infertilidade, uma vez que dispomos de técnicas mais elaboradas para o estudo da infertilidade feminina, bem como um maior desenvolvimento de técnicas para a tratar, ao contrário do que acontece na infertilidade masculina. Enquanto que a infertilidade

feminina é muitas vezes tratada de forma farmacológica, à base de tratamentos hormonais que têm os seus inerentes riscos, a infertilidade masculina é muitas vezes colmatada com o recurso a métodos de PMA. Isto acarreta por si só um maior risco e pressão psicológica para a mulher. Além disso, o próprio *status* da mulher na sociedade é muitas vezes dependente da sua fertilidade, sendo que a incapacidade de ter filhos pode ser causa de divórcios ou discriminação em algumas culturas<sup>3,9,10</sup>. É por isso importante alertar para a realidade da infertilidade masculina, quebrando tabus e proporcionando um maior estado de Saúde Sexual e Reprodutiva para todos os indivíduos, independentemente do seu género.

Estima-se que existam cerca de 48,5 milhões de casais inférteis em todo o mundo. Contudo, os estudos epidemiológicos sobre fertilidade masculina são escassos, uma vez que os inquéritos populacionais sobre o assunto normalmente entrevistam casais ou apenas o elemento feminino do casal, e porque em países com sociedades patriarcais, a infertilidade masculina não é reportada, sendo que a responsabilidade da infertilidade recai sobre a mulher<sup>11</sup>. Numa revisão da literatura realizada por Agarwal *et al.* demonstrou-se que a taxa de infertilidade atribuível ao factor masculino, a nível mundial, varia entre 20% e 70%<sup>11</sup>.

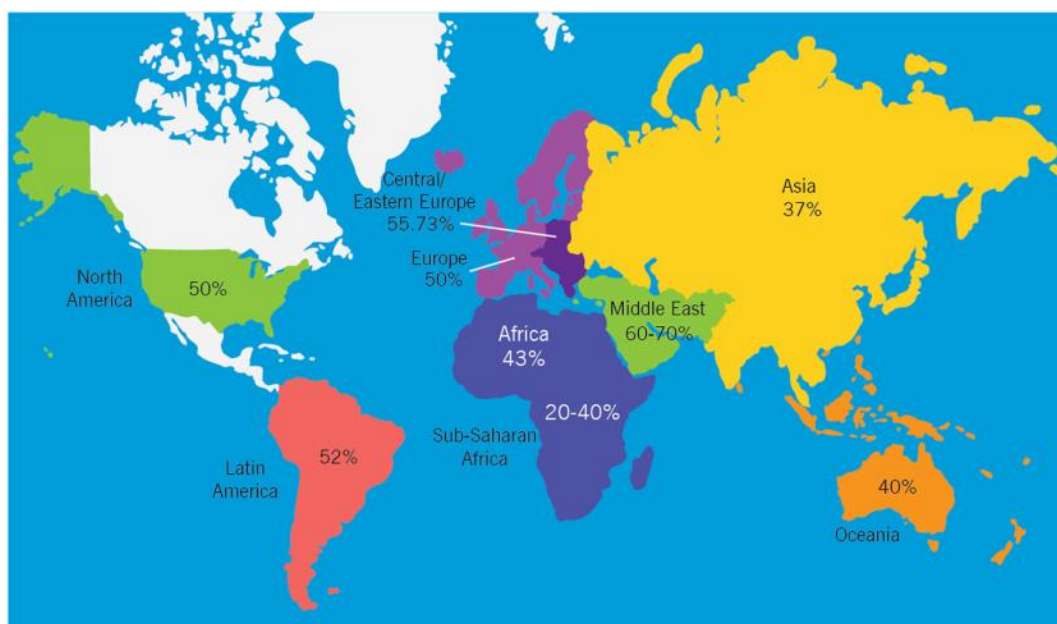


Figura 1 - Distribuição mundial dos casos de infertilidade atribuídos a factor masculino (adaptado de Agarwal *et al.*, 2015)

De uma forma geral, cerca de 50% dos casos de infertilidade que ocorrem nos países desenvolvidos têm uma componente masculina (Figura 1). No entanto, é necessário ter em conta que nos países em desenvolvimento os dados estão fortemente enviesados devido ao estatuto social do homem, conforme referido anteriormente, sendo que nos países desenvolvidos a infertilidade masculina é melhor aceite e, conseqüentemente, os doentes

procuram mais ajuda por parte dos serviços de saúde, existindo portanto um maior relato destas situações<sup>11</sup>. Por outro lado, as prevalências de infertilidade feminina descritas por Mascarenhas *et al.* são superiores nos países em vias de desenvolvimento, quando comparadas com os países desenvolvidos (Figura 2)<sup>10</sup>.

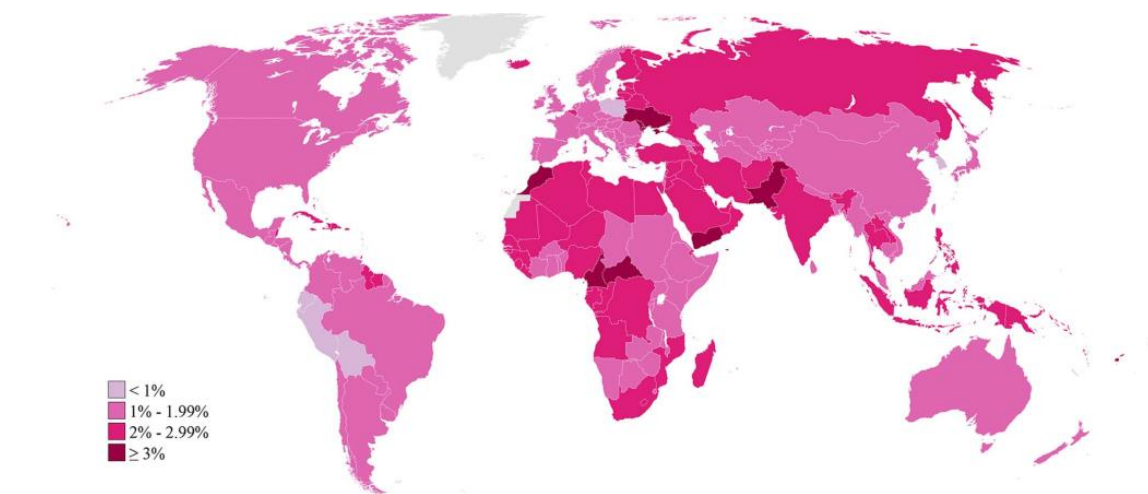


Figura 2 - Prevalência de infertilidade primária em mulheres, a nível mundial, em 2010 (adaptado de Mascarenhas *et al.*, 2012)

## Fisiologia reprodutiva masculina

A espermatogénese ocorre nos túbulos seminíferos sob o controlo do eixo Hipotálamo-Hipófise-Gónada (HHG). Tem início na adolescência, cerca dos 13 anos, e ocorre ao longo de toda a vida, havendo, contudo, uma marcada redução nos indivíduos mais velhos. A Hormona Libertadora de Gonadotrofinas (GnRH) é libertada pelo Hipotálamo, sendo lançada para o Sistema Porta-Hipofisário e estimulando a Hipófise a produzir a Hormona Luteinizante (LH) e a Hormona Folículo-estimulante (FSH). A síntese e secreção de GnRH depende da integração de vários sinais, incluindo neurotransmissores, factores de crescimento, citocinas, metabolitos e esteroides sexuais, entre outros. A LH vai ser responsável pela produção de testosterona ao nível das células de Leydig, no testículo, enquanto que a FSH vai estimular as células de Sertoli, estimulação esta que é necessária para a conversão de espermatídeos em espermatozoides (Figura 3)<sup>12</sup>.

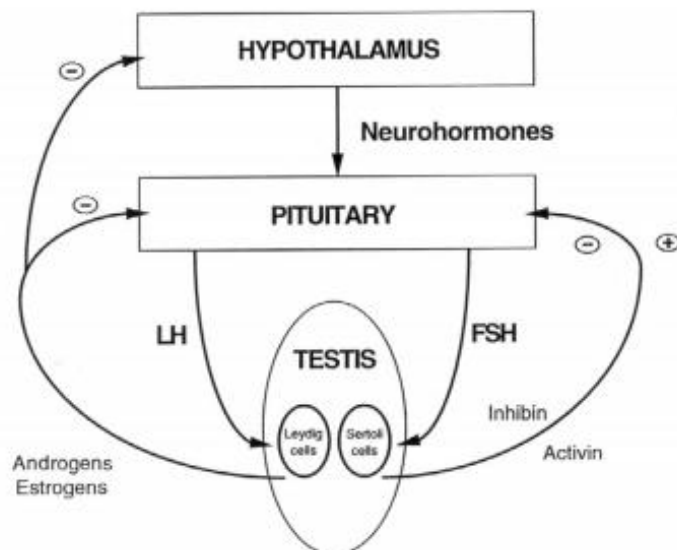


Figura 3 - Eixo Hipotálamo-Hipófise-Gônada (adaptado de Ing et al., 2018)

Durante a espermatogénese, as espermatogónias presentes na base dos túbulos seminíferos começam por se dividir por mitose, de forma a, por um lado, manter o seu número de células estaminais e, por outro, originar espermatócitos primários. Estes espermatócitos vão sofrer meiose, dando origem a espermatócitos secundários e, posteriormente, a espermatídeos. Estes últimos são já células haplóides, e irão diferenciar-se em espermatozoides que serão depois libertados no lúmen dos túbulos seminíferos (Figura 4). A espermatogénese tem uma duração total de 74 dias<sup>12-14</sup>.

O espermatozoide pode ser dividido em 3 zonas<sup>13</sup>:

- Cabeça – contém o núcleo e acrossoma. O núcleo armazena o material genético em haploidia (cromossomas somáticos e cromossoma X ou Y). Já o acrossoma é responsável por conter as enzimas hidrolíticas necessárias para a digestão do invólucro do ovócito, permitindo assim a sua fertilização;
- Peça intermediária – contém mitocôndrias necessárias para produção de energia;
- Cauda – contém o flagelo.

Após maturação, os espermatozoides são armazenados no epidídimo, onde se encontram quiescentes. Durante a ejaculação, vão entrar em contacto com as secreções das glândulas acessórias masculinas, que por sua vez vão activar a motilidade dos espermatozoides<sup>14</sup>.

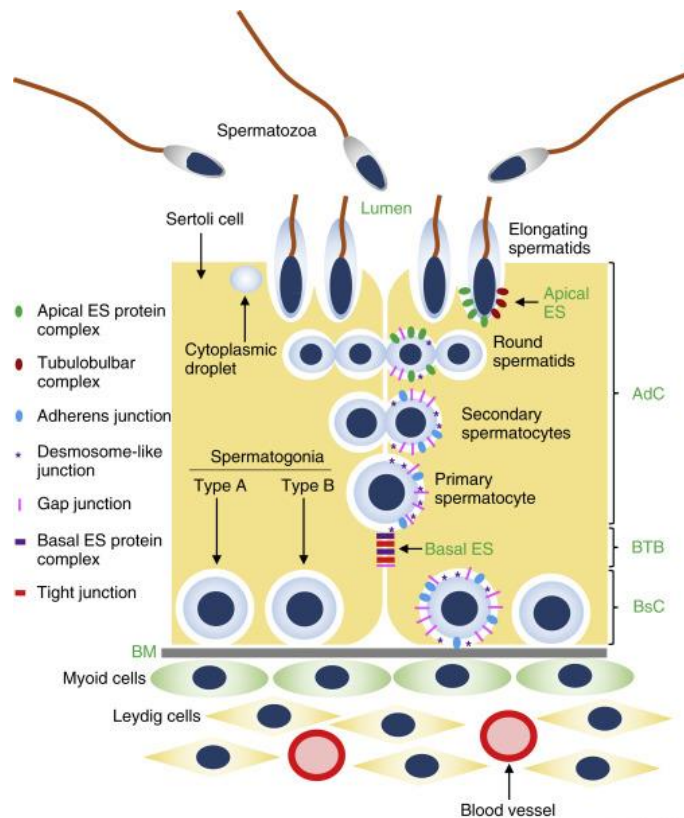


Figura 4 - Espermatogênese (ES - especialização ectoplásmica; AdC - compartimento adluminal; BTB - barreira sangue-testículo; BsC - compartimento basal; BM - membrana basal) (adaptado de Nishimura et al., 2017)

Após um estímulo psicológico, visual, auditivo, olfatório ou tátil, há ativação do sistema nervoso parassimpático, com liberação de acetilcolina e consequente dilatação das artérias pudendas, levando ao aumento do fluxo de sangue nos corpos cavernosos e esponjoso. Isto conduz a compressão venosa e consequente turgescência do pênis, levando à sua ereção. A passagem dos espermatozoides pela uretra está sob o estímulo do sistema nervoso simpático, que vai provocar a contração do músculo liso ao nível do epidídimo e ductos deferentes. O estímulo parassimpático também vai levar à secreção do conteúdo das glândulas uretrais e bulbouretrais. Durante a ejaculação propriamente dita, os estímulos simpático e somático levam à contração dos músculos bulbocavernosos, provocando assim a ejeção do sêmen através da uretra. A detumescência do pênis resulta do estímulo simpático, que causa a dilatação da vasculatura peniana e consequente flacidez<sup>14</sup>.

As glândulas sexuais acessórias do homem incluem a próstata, vesículas seminais e glândulas bulbouretrais, e em conjunto produzem o plasma seminal, importante para a neutralização do ambiente ácido da vagina e para a manutenção da viabilidade dos espermatozoides após a ejaculação<sup>15</sup>. A próstata vai produzir e secretar o fluido prostático, que contém moléculas necessárias para o metabolismo dos espermatozoides durante o processo de fertilização<sup>16</sup>. O



fluido secretado pelas vesículas seminais é essencial para a nutrição e suporte energético dos espermatozoides, protegendo-os do *stress* oxidativo e destruição imunológica<sup>15</sup>. Por último, as glândulas bulbouretrais secretam uma solução alcalina, com glicoproteínas, que neutraliza a acidez do trato urinário e o lubrifica antes da ejaculação<sup>14</sup>.

Após as relações sexuais desprotegidas, os espermatozoides são depositados na vagina e, posteriormente, migram ao longo do cérvix, onde estão em contacto com o muco cervical, que pode conter anticorpos anti-espermatozoides, funcionando como uma barreira à fertilização. Para além do movimento próprio dos espermatozoides, a peristalse uterina facilita a sua progressão até às trompas de Falópio. Durante este trajecto, o próprio espermatozoide vai sofrendo alterações, num processo denominado de *capacitação*. Neste processo, o espermatozoide passa a um estado de motilidade hiperactivada, ganhando capacidade de penetrar as camadas externas do óvulo, sendo que para tal o espermatozoide perde algumas das suas proteínas de superfície<sup>14</sup>. Ao nível da ampola das trompas de Falópio, os espermatozoides encontram o óvulo, rodeado pela *corona radiata* e pelo *cúmulos oóforo*, tendo de penetrar ambas as camadas (Figura 5). Depois de penetrarem a *corona radiata*, os espermatozoides ligam-se à zona pelúcida e sofrem uma reacção acrosomal, com fusão da porção externa da membrana acrosomal com a membrana plasmática. Apenas após completar esta fase é que o espermatozoide consegue penetrar totalmente a zona pelúcida, através dos movimentos de propulsão da cauda do espermatozoide e da digestão enzimática ao longo do seu caminho. Depois de penetrar a zona pelúcida, o espermatozoide atravessa o espaço perivitelino e só depois é que entra em contacto com o óvulo em si, conseguindo então fundir-se com a sua membrana plasmática. Após esta fusão, ocorre uma despolarização da membrana plasmática do óvulo, impedindo assim a poli-espermia, ou seja, a fertilização do óvulo por mais do que um espermatozoide. De seguida, ocorre a descondensação do núcleo do espermatozoide e completa-se a meiose no óvulo fecundado<sup>17,18</sup>.

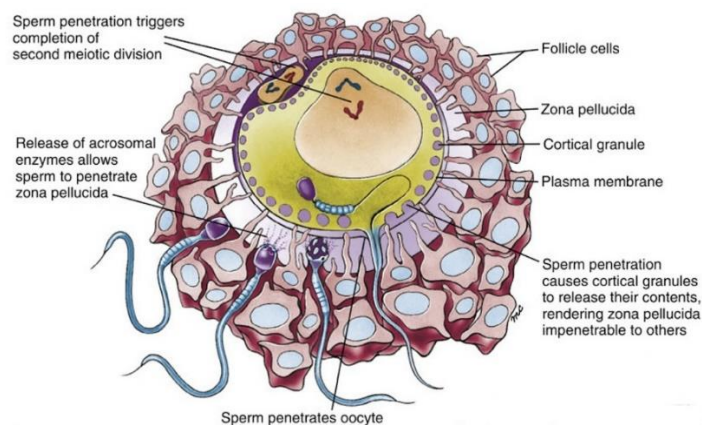


Figura 5 - Fertilização (adaptado de Schoenwolf et al., 2014)

## Factores que afectam a qualidade espermática

A Saúde Sexual e Reprodutiva de um indivíduo resulta de vários aspectos, nomeadamente comportamentais, económicos e de saúde em geral, sendo que todos eles se encontram interligados (Figura 6).

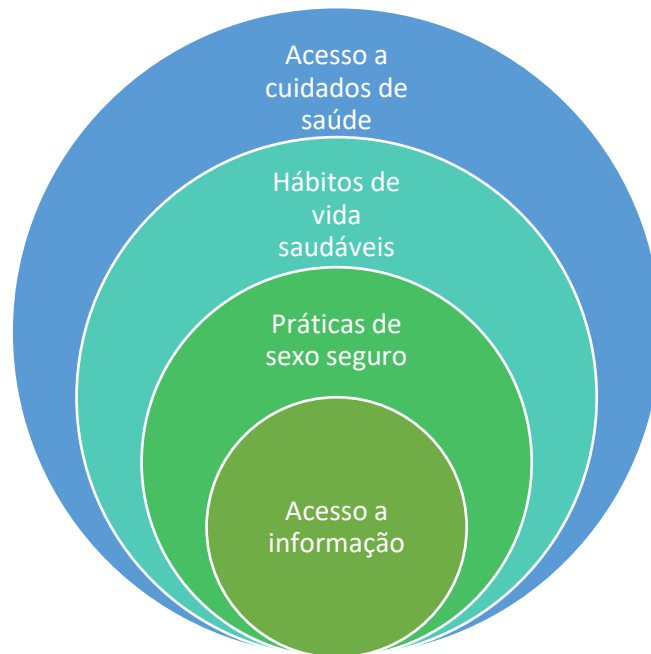


Figura 6 - Factores condicionantes de infertilidade

Infeções sexualmente transmissíveis, nomeadamente infeções por *Neisseria gonorrhoeae* e *Chlamydia trachomatis*, estão na base de Doença Inflamatória Pélvica nas mulheres, podendo levar a infertilidade. Os estudos sobre o impacto destas infeções na fertilidade masculina são muitas vezes contraditórios e com muitas limitações, pelo que não é possível afirmar com toda a certeza que estas infeções também reduzem a fertilidade masculina. Contudo, pensa-se que exista uma associação entre algumas infeções sexualmente transmissíveis e a redução da fertilidade masculina<sup>19,20</sup>. A melhor forma de prevenir a infeção passa por práticas de sexo seguro, com uso de preservativo. Para tal, é importante apostar na educação da população, começando nas camadas mais jovens, devido ao maior risco de práticas de sexo não protegido, e na consciencialização da população para os riscos a curto e longo prazo<sup>3,10</sup>. O acesso à informação é preponderante para a adoção de práticas saudáveis, permitindo a todos os indivíduos, independentemente do seu género, o controlo sobre a sua vida sexual e reprodutiva, evitando a propagação de infeções sexualmente transmissíveis, gravidezes indesejadas e as consequências daí decorrentes<sup>3</sup>.

Por outro lado, os hábitos de vida saudáveis também são preponderantes para a boa Saúde Sexual e Reprodutiva dos indivíduos. O tabagismo está associado à exposição a nicotina, monóxido de carbono, metais pesados, espécies reactivas de oxigénio, entre outros, o que leva à redução da qualidade e quantidade espermática, redução da motilidade e alterações da morfologia dos espermatozoides, sendo o seu efeito mais marcado naqueles com maiores cargas tabágicas<sup>21,22</sup>. Os efeitos do tabaco são notórios também na descendência, conforme evidenciado por estudos em modelos animais. Sobinoff *et al.* demonstraram que o consumo materno de tabaco durante a gestação e amamentação está relacionado com a diminuição, na progenia, da população de células germinativas, dano no DNA (ácido desoxirribonucleico) das células germinativas e espermatozoides anómalos<sup>23</sup>. Noutro estudo, foi avaliado o impacto do tabaco na descendência feminina, também num modelo animal, verificando-se uma redução do número de oócitos, um aumento dos níveis de *stress* oxidativo nos oócitos remanescentes e diminuição da interação espermatozoide-oócito, o que levou a subfertilidade, aumento do tempo necessário para procriar e diminuição do tamanho das ninhadas<sup>24</sup>.

Vários estudos efectuados até ao momento demonstraram que uma dieta tipicamente mediterrânica, rica em ácidos gordos ómega 3, antioxidantes e vitaminas, e com baixo consumo de ácidos gordos saturados e trans, está associada a menos casos de homens com parâmetros espermáticos abaixo dos valores de referência. Enquanto que o consumo de legumes, fruta, peixe, carne de aves, cereais e produtos lácteos com baixos níveis de gordura está associado a uma melhor qualidade espermática, uma dieta rica em carnes processadas, lacticínios gordos, álcool e bebidas açucaradas está correlacionada com uma diminuição da qualidade do ejaculado e baixas taxas de fecundidade<sup>25</sup>.

O consumo diário de álcool está também associado a uma diminuição do volume de ejaculado e a uma alteração da morfologia dos espermatozoides<sup>22,26</sup>. Este efeito ocorre por interferência no eixo HHG, interferindo com a produção de GnRH, FSH, LH e testosterona, bem como alterando a função das células de Leydig e Sertoli. Consequentemente, existe uma diminuição da espermatogénese, com diminuição da qualidade do ejaculado e dos níveis de hormonas masculinas<sup>21</sup>. O uso de drogas recreativas, como marijuana e cocaína, foi já associado à diminuição da concentração, número total de espermatozoides e motilidade, bem como morfologia anormal<sup>21</sup>.

O excesso de massa adiposa é responsável pelo aumento da conversão de testosterona em estrogénio, que por sua vez vai interferir com o eixo HHG, diminuindo a libertação de gonadotrofinas e alterando a espermatogénese, como resultado de um hipogonadismo

secundário. Além disso, o aumento de leptina proveniente do tecido adiposo é responsável pela diminuição de testosterona<sup>22</sup>. Por outro lado, o excesso de peso e a obesidade estão associados a um estado pró-inflamatório, com produção aumentada de espécies reactivas de oxigénio. A própria adiposidade escrotal é responsável pelo aumento da temperatura local. Todos estes factores resultam numa alteração da espermatogénese, aumento do *stress* oxidativo, diminuição da motilidade dos espermatozoides, fragmentação do DNA e diminuição da interação espermatozoide-ócito<sup>5,21</sup>.

Actualmente, verifica-se um aumento da pressão social para que, tanto homens como mulheres, tenham um corpo “ideal”, fomentando o consumo de uma alimentação saudável e a prática de exercício físico. Contudo, tem-se verificado, paralelamente, um aumento do consumo de esteroides anabolisantes androgénicos, quer por atletas como por não-atletas. Este grupo de fármacos é composto por testosterona e derivados. No entanto, verificou-se que a administração de testosterona externa exerce um *feedback* negativo no eixo HHG, suprimindo a espermatogénese, provocando atrofia testicular, infertilidade, perda de libido e disfunção erétil<sup>22</sup>. Consequentemente, ocorre hipogonadismo hipogonadotrófico, podendo existir azoospermia transitória cuja recuperação pode demorar até 2 anos. O efeito desta classe de fármacos é dependente da dose, duração do consumo e tipo de esteroide usado<sup>21</sup>.

Conforme referido anteriormente, o excesso de peso e a obesidade estão correlacionados com uma diminuição da qualidade do ejaculado. O exercício físico nestes indivíduos permite aumentar a concentração, motilidade progressiva e o número de espermatozoides com morfologia normal, bem como os níveis de testosterona<sup>27</sup>. Contudo, nem todo o tipo de exercício físico parece ser benéfico, dependendo não só do tipo de exercício em si, mas também da sua duração e frequência. O ciclismo é o principal exemplo de potenciais efeitos adversos do exercício físico, principalmente quando praticado na estrada. Wise *et al.* demonstraram que existe uma associação entre a prática de ciclismo durante mais de 5 horas semanais e a redução da concentração e motilidade dos espermatozoides<sup>28</sup>. Num estudo realizado na República do Malawi, onde ocorreu um aumento do uso de táxis-bicicleta, verificou-se que os condutores destes veículos apresentavam um menor volume, concentração, motilidade total e motilidade progressiva dos espermatozoides, e ao mesmo tempo apresentavam um aumento da concentração de espermatozoides com morfologia anormal, quando comparado com um grupo controlo saudável, com uma profissão diferente<sup>29</sup>. A relação entre a prática de ciclismo e a redução dos parâmetros de fertilidade está relacionada com o impacto mecânico de estar sentado no selim, o sobreaquecimento das gónadas e o uso de roupas apertadas<sup>30</sup>. Os estudos referentes a outros tipos de exercício, nomeadamente a corrida e o levantamento de pesos, são

ainda inconclusivos quanto ao impacto na fertilidade masculina, existindo inclusive estudos discordantes entre si<sup>31,32</sup>. Quanto aos desportos de impacto, como por exemplo *wrestling*, *skate*, *lacrosse* e basebol, a lesão testicular pode levar a infertilidade devido a hipogonadismo primário, através da diminuição da produção hormonal, ou hipogonadismo secundário, devido à formação de anticorpos anti-espermatozoides, pelo que o uso de coquilha neste tipo de desportos é altamente recomendável. No entanto, a incidência de trauma testicular é, ainda assim, muito baixa e não parece ter um impacto substancial nas taxas de infertilidade globais<sup>32</sup>. Contudo, importa referir que o exercício regular e moderado, de uma forma geral, não parece ter um impacto negativo na fertilidade masculina<sup>30</sup>.

Bhongade *et al.* conseguiram correlacionar o *stress* psicológico com a alteração de parâmetros de fertilidade. No seu estudo, o *stress* psicológico foi avaliado através de um questionário validado (*Hospital Anxiety and Depression Score*) e, posteriormente, correlacionado com as alterações observadas no espermograma e níveis hormonais. Desta forma, verificaram que os níveis aumentados de *stress* psicológico provocavam uma diminuição da testosterona total presente no sangue, com conseqüente aumento secundário dos níveis de LH e FSH. Como resultado final, a qualidade espermática nestes indivíduos estaria alterada, com diminuição da contagem de espermatozoides, da motilidade e das formas morfológicas normais<sup>33</sup>.

De acordo com a literatura, verifica-se um declínio progressivo dos parâmetros avaliados no espermograma que acompanha o incremento da idade dos homens. Assim, a partir dos 34 anos verifica-se uma diminuição da contagem total de espermatozoides e da sua motilidade total, e a partir dos 40 anos parece existir uma redução da concentração espermática e da fração de espermatozoides com morfologia normal. Com o avançar da idade, verifica-se uma redução da motilidade progressiva a partir dos 43 anos e uma redução do volume de ejaculado a partir dos 45 anos<sup>21</sup>.

A exposição a metais pesados, solventes orgânicos, pesticidas e compostos químicos disruptores endócrinos tem vindo a levantar sérias preocupações na área da saúde reprodutiva. A contaminação do Homem pode ocorrer através da exposição ocupacional, ambiental ou pela própria alimentação. Chumbo, mercúrio, cádmio, crómio, percloro-etileno, tolueno, xileno, benzeno e pesticidas organofosforados são alguns dos compostos que foram até agora identificados como reduzindo a fertilidade quer feminina como masculina<sup>34</sup>.

Outros factores condicionantes da qualidade espermática são ainda controversos, como é o caso das alterações do sono. A secreção de testosterona segue um padrão diurno, com níveis máximos durante o sono, estando relacionada com o início do sono REM (*Rapid Eye Movement*),

mas não com a concentração de melatonina. Apesar de existirem estudos que demonstram alterações nos parâmetros de qualidade espermática em doentes com patologia do sono (apneia obstrutiva do sono, insónia e *shift-work disorder*), os resultados nem sempre são congruentes, e ainda não foram identificados quais os mecanismos implicados neste processo<sup>35</sup>.

## Bancos de Gâmetas

O primeiro banco de gâmetas masculinos com um objectivo terapêutico foi criado em 1964, no Iowa, nos Estados Unidos da América. Contudo, a criopreservação de espermatozoides humanos remonta a 1949, e a primeira gravidez com gâmetas masculinos descongelados terá ocorrido em 1953. Só com o desenvolvimento destas técnicas é que foi possível criar e expandir os bancos de gâmetas a nível mundial. Deste então, só nos Estados Unidos da América, já terão nascido mais de 1 milhão de crianças graças à doação de gâmetas masculinos<sup>36</sup>.

Apesar de diferentes países europeus terem diferentes regras quanto à doação de gâmetas, em 1996 foi criado um documento com linhas orientadoras, de forma a uniformizar algumas regras para a doação de espermatozoides. Assim, no que diz respeito ao recrutamento de dadores, definiu-se que os dadores devem ser informados quanto ao uso dos seus gâmetas, número máximo de famílias que poderão ter filhos a partir dos seus gâmetas, quais os riscos médicos dos procedimentos e a legislação e regras do centro em causa. Além disso, deverá ser prestado aconselhamento, sendo necessário consentimento informado, podendo a qualquer altura o dador retirar o seu consentimento para o uso dos gâmetas. Os dadores deverão ter pelo menos 18 anos e não mais que 45 anos. Deverá ser encorajada a doação anónima de gâmetas e não remunerada, contudo poderão ser pagas as despesas de deslocação devidamente documentadas. Estas despesas pagas deverão ter um montante máximo, de modo a garantir que a remuneração monetária não é o principal motivo de doação<sup>37</sup>.

Deverá ser realizada uma avaliação da história médica passada do dador, bem como do seu actual estado de saúde, por um médico. Deverá ser realizado um *screening* de doenças infecciosas, sendo que na avaliação inicial o dador deverá ser negativo para as seguintes doenças: HIV (Vírus da Imunodeficiência Humana) 1 e 2, HTLV (Vírus linfotrópico das células T humanas) I e II (de acordo com a prevalência local), Sífilis, Hepatite B e C, *Neisseria gonorrhoea* e *Chlamydia trachomatis*. Na avaliação final, deverá ser negativo para *Neisseria gonorrhoea* e *Chlamydia trachomatis*. Após 6 meses de quarentena deverá ser negativo para HIV 1 e 2 e HTLV I e II (se aplicável), Sífilis, Hepatite B e C. Tanto na avaliação inicial como ao fim de 6 meses de

quarentena, os dadores deverão ser avaliados quanto à infeção por citomegalovírus e, se se verificar seroconversão, o dador deverá ser rejeitado. Deverá ser feita uma análise do cariótipo do dador, podendo ser pertinente avaliar doenças recessivas prevalentes em certas etnias. Dadores que apresentem doenças hereditárias *major* deverão ser rejeitados. Contudo, se for detetado um factor de risco genético no dador, a decisão quanto ao uso ou não dos seus gâmetas deverá ser tomada em conjunto com um geneticista<sup>37</sup>.

Os centros deverão garantir os mais altos padrões de qualidade nos procedimentos e armazenamento dos gâmetas, devendo ser regulados por procedimentos bem definidos. Nos centros de doação deverão trabalhar pessoas devidamente treinadas e com recurso a todos os equipamentos necessários. Os programas de doação de gâmetas deverão ser coordenados por equipas multidisciplinares, com um nível mínimo de actividade, de acordo com a situação geográfica, e deverão ser garantidos os procedimentos de controlo de qualidade. Pode ser possível trocar gâmetas entre centros que apresentem os mesmos *standards* mas o comércio de gâmetas deverá ser proibido. Apenas podem ser usados gâmetas masculinos que tenham estado em quarentena durante pelo menos 6 meses, após a realização de *screening* para doenças infecto-contagiosas, antes e depois da quarentena. Não podem ser usados espermatozoides de 2 dadores diferentes no mesmo ciclo de tratamento. Os registos médicos dos dadores deverão ser guardados em ficheiros separados no centro<sup>37</sup>.

Os beneficiários deverão ser informados quanto aos métodos de recrutamento e *screening* dos dadores, riscos médicos do tratamento, legislação, procedimentos e respectiva taxa de sucesso de inseminação ou de fertilização no centro em questão. Os beneficiários deverão ainda receber aconselhamento e deverão dar o seu consentimento informado. A doação de gâmetas não deverá ser usada para fins eugénicos, devendo existir uma compatibilidade entre as características fenotípicas do dador e do(s) beneficiário(s). Os beneficiários seronegativos para citomegalovirus apenas deverão receber gâmetas de dadores que também o sejam. Apesar do risco de consanguinidade consequentemente à doação de gâmetas ser muito baixo, o número de crianças que nascem a partir de um determinado dador deve ser limitado e controlado, bem como devido a razões sociais e psicológicas. Uma vez que, numa mesma família, várias crianças podem ser concebidas usando gâmetas do mesmo dador, deverá ser controlado o número de famílias beneficiárias desse mesmo dador<sup>37</sup>.

O centro deverá manter um registo do resultado dos tratamentos realizados com recurso à doação de gâmetas, incluindo o número de gravidezes resultantes. Cada centro deverá fornecer informação pública, anualmente, relativa aos tratamentos e respectivas taxas de sucesso<sup>37</sup>.

## Banco Público de Gâmetas Português

A ideia da criação do primeiro Banco Público de Gâmetas (BPG) em Portugal remonta ao ano de 2009, altura em que o Conselho Nacional de Procriação Medicamente Assistida (CNPMA) se pronunciou acerca da imperiosidade de criar um BPG, destinado a facilitar os tratamentos de fertilidade com recurso a gâmetas de dadores, no Serviço Nacional de Saúde. Em 2010, o Centro Hospitalar Universitário do Porto (CHUP) apresentou uma proposta para a criação de um BPG, que recebeu parecer favorável do CNPMA poucos meses depois. A criação do BPG no Centro de Procriação Medicamente Assistida do CHUP foi aprovada em 2011, pelo Despacho ministerial nº 3219/2011 de 17 de Fevereiro, iniciando a sua actividade a 23 de Maio de 2011. Posteriormente, em 2017, foi desenvolvida uma rede nacional de Centros Públicos de PMA, afiliados ao BPG, no Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra e no Centro Hospitalar Universitário de Lisboa Central (Maternidade Dr. Alfredo da Costa). Estes centros afiliados são responsáveis pelo recrutamento e seleção dos dadores, bem como pela colheita, controlo e criopreservação dos respectivos gâmetas que recolham. O armazenamento e distribuição dos gâmetas é da responsabilidade do BPG do Centro de Procriação Medicamente Assistida do CHUP. A abertura destes centros afiliados de colheita permitiu alargar a actividade do BPG a todo o território nacional<sup>38,39</sup>.

De acordo com as recomendações do CNPMA, cada dador masculino não pode estar na origem de nados-vivos em mais do que 8 famílias. Mais ainda, de acordo com as regras do BPG, cada dador deverá ter entre 18 e 40 anos e poderá fazer até um máximo de 7 dádivas. A doação deverá ser voluntária e não remunerada. No entanto, os dadores de gâmetas masculinos poderão ser ressarcidos pelas despesas efectuadas ou dos prejuízos resultantes da dádiva, no valor máximo de um décimo do valor do Indexante de Apoios Sociais (IAS) em vigor, por dádiva e no momento da realização das análises pós-quarentena. Ficam ainda isentos do pagamento de taxas moderadoras no Serviço Nacional de Saúde durante 3 anos. Desde Maio de 2018, a doação de gâmetas em Portugal deixou de estar ao abrigo do anonimato, conforme decidido pelo Acórdão do Tribunal Constitucional nº 225/2018. A seleção dos dadores de gâmetas passa por um processo rigoroso de avaliação dos candidatos, consistindo numa consulta de Avaliação da Fertilidade, consulta de Psicologia, realização de análises sanguíneas, estudo genético (com aconselhamento prévio em consulta de Genética Médica) e avaliação dos parâmetros espermáticos<sup>40-42</sup>.



## Avaliação e seleção dos candidatos a dadores

Na primeira consulta no BPG do CHUP, é realizada uma entrevista aos candidatos, de forma a avaliar brevemente se o potencial dador não tem alguma característica *major* que o exclua *à priori*. Para tal, é tida em consideração a idade do candidato, que deverá ser entre os 18 e os 40 anos, a história médica pessoal e familiar, com particular ênfase para patologia infecciosa, familiar, hereditária e genética. Após esta primeira consulta, é realizada a colheita de gâmetas para avaliação citobioquímica, bem como a colheita de sangue para *screening* de doenças infecciosas (Hepatite B, Hepatite C, HIV 1 e 2, Sífilis, e outros agentes dependendo da origem geográfica e história de viagens anteriores, nomeadamente HTLV I e II). Posteriormente, os candidatos terão ainda uma consulta de psicologia de forma a avaliar as suas motivações para a doação, nomeadamente o risco de coação financeira<sup>43,44</sup>.

Contudo, basta o candidato preencher um dos critérios de exclusão listados na Tabela I ou não preencher um dos parâmetros de aceitação do espermograma principal (Tabela II) para que o processo de doação não prossiga. Nesse caso, o candidato é informado e, se necessário, referenciado para consulta de especialidade (por exemplo, Genética Médica ou Andrologia). O espermograma principal consiste no espermograma inicial, realizado aquando da primeira visita ao BPG<sup>45,46</sup>. Importa salientar que os critérios espermáticos para aceitação de um indivíduo enquanto dador de gâmetas são diferentes e mais exigentes do que aqueles considerados como referência para a população, de acordo com a *World Health Organization* (WHO) (Tabela III).

Tabela I - Critérios de exclusão de candidatos a dadores

<b>Critérios de exclusão de candidatos a dadores</b>
História clínica não satisfatória
Espermograma principal não satisfatório
Avaliação negativa na consulta de psicologia
Serologias alteradas
Parâmetros espermáticos pós-descongelção da amostra não satisfatórios
Positividade para <i>Chlamydia</i> na urina
Patologia genética
Parâmetros espermáticos em dádiva não satisfatórios
Serologias pós-quarentena alteradas
Desistência em dádiva
Impossibilidade de comparência para análises pós-quarentena

Posteriormente, será feita a primeira dádiva, que será submetida a criopreservação e descongelção de forma a avaliar a viabilidade dos espermatozoides. O dador poderá fazer um

máximo de 7 dádivas no total, sendo que, aquando da segunda dádiva, é colhida urina para avaliação de infeção por *Chlamydia* e sangue para estudo genético, incluindo cariótipo e pesquisa de mutação para fibrose quística e atrofia muscular espinhal. A avaliação final é feita 6 meses após a última dádiva, de forma a garantir um período de quarentena que permita confirmar a negatividade das serologias e marcadores víricos, condição necessária para o uso das amostras de gâmetas<sup>47</sup>.

Todas as dádivas são validadas após teste de descongelação, de forma a garantir o controlo de qualidade da amostra total. Caso duas dádivas não cumpram os critérios de aceitação, o dador será excluído definitivamente<sup>47</sup>.

*Tabela II - Valores seminais de aceitação para espermograma principal*

<b>Critérios</b>	<b>Valores de referência do BPG</b>
<b>Aglutinação</b>	Ausente
<b>Volume</b>	≥ 1,5 ml
<b>pH</b>	≥ 7,2 (e < 9)
<b>Concentração</b>	≥ 60x10 <sup>6</sup> espermatozoides/ml Ou 90x10 <sup>6</sup> espermatozoides/ejaculado com volume ≥ 1,5ml
<b>Motilidade</b>	≥ 50% de formas progressivas
<b>Morfologia</b>	≥ 4% normais
<b>Leucócitos</b>	≤ 1x10 <sup>6</sup> /ml

Algumas das anomalias dos parâmetros espermáticos podem ser classificadas em:

- Azoospermia – ausência de espermatozoides no ejaculado após centrifugação;
- Oligozoospermia – concentração < 15x10<sup>6</sup> de espermatozoides/ml;
- Astenozoospermia – motilidade progressiva < 32%;
- Teratozoospermia – percentagem de formas normais < 4%;
- Oligoastenoteratozoospermia – redução da concentração, motilidade progressiva e formas normais;
- Oligoteratozoospermia – diminuição da concentração e da percentagem de formas normais;
- Oligoastenozoospermia – diminuição da concentração e da motilidade progressiva;
- Astenoteratozoospermia – redução da motilidade progressiva e da percentagem de formas normais.

Tabela III - Valores seminais de referência para a população, de acordo com a WHO

<b>Crítérios</b>	<b>Valores de referência da população</b>
<b>Volume</b>	≥ 1,5 ml
<b>pH</b>	≥ 7,2
<b>Concentração</b>	≥ 15x10 <sup>6</sup> espermatozoides/ml
<b>Motilidade</b>	≥ 32% de formas progressivas
<b>Morfologia</b>	≥ 4% normais
<b>Leucócitos</b>	≤ 1x10 <sup>6</sup> /ml

# Objectivos

Nas últimas décadas, alguns estudos têm vindo a verificar uma diminuição dos parâmetros avaliados pelo espermograma, sugerindo uma diminuição da fertilidade masculina. Contudo, tais conclusões devem ser feitas de forma cuidadosa, uma vez que os diferentes estudos apresentam vieses de seleção, com uma grande heterogeneidade geográfica, étnica e metodológica<sup>48,49</sup>.

Em Portugal, apenas uma minoria dos potenciais dadores masculinos avaliados no BPG reúnem as condições necessárias para se tornarem dadores efectivos, na medida em que, apesar de apresentarem espermogramas normais, não cumprem os critérios espermáticos de admissibilidade do BPG. Assim, este trabalho pretende estudar de forma retrospectiva a saúde reprodutiva da população portuguesa, tendo como objetivo identificar os factores de risco que mais afetam a fertilidade masculina. Para tal, os potenciais dadores de gâmetas masculinos avaliados no Banco Público de Gâmetas/Centro de Procriação Medicamente Assistida do Centro Hospitalar Universitário do Porto serão utilizados como amostra da população nacional.

Este trabalho reveste-se de grande importância, uma vez que não foram até agora realizados estudos na população portuguesa que permitam correlacionar os diversos factores de risco conhecidos com uma eventual redução dos indicadores de fertilidade masculina.

# Material e Métodos

## Colheita dos dados

Todos os candidatos a dadores de gâmetas masculinos do Banco Público de Gâmetas, inscritos entre Maio de 2011 e Dezembro de 2018, foram considerados para este estudo. A partir da base de dados do BPG, foi recolhida informação sobre idade aquando da doação, estado civil, profissão, número de filhos prévios, dados antropométricos, características fenotípicas (cor do cabelo, textura do cabelo, cor dos olhos, cor da pele, etnia), história médica actual e passada, história familiar, exposição ocupacional, avaliação laboratorial do espermograma e avaliação serológica. Todas as amostras de sémen foram recolhidas por masturbação, no BPG, após um período recomendado de 2 a 3 dias de abstinência sexual. Todos os dados foram anonimizados através da realização de uma tabela cruzada, gerando-se um código para cada candidato.

A colheita dos dados e a realização do presente estudo foram previamente analisadas e autorizadas pela Comissão de Ética para a Saúde, pelo Gabinete Coordenador de Investigação, pela Direção do Departamento de Ensino, Formação e Investigação do Centro Hospitalar Universitário do Porto e pelo seu Presidente do Conselho de Administração [N/REF.<sup>a</sup> 2018.227(197-DEFI/196-CES)].

## Análise estatística

Todos os dados foram analisados através da ferramenta estatística *IBM SPSS Statistics 25*. Todos os dados são expressos como média  $\pm$  erro padrão ( $\pm$  SEM), salvo indicação do contrário. Foi considerado como sendo estatisticamente relevante um nível de significância de 0,05. Os níveis de significância são apresentados da seguinte forma: \* para  $p < 0,05$  e \*\* para  $p < 0,01$ .

O teste *T* para amostras independentes foi utilizado para comparar conjuntos de dados obtidos a partir de grupos independentes de indivíduos, nomeadamente a idade, IMC e factores de risco e os parâmetros do espermograma. Posteriormente, foi utilizado o teste *ANOVA* para avaliar as diferenças e interações entre os factores sociodemográficos e de risco e os parâmetros do espermograma.

A evolução dos vários parâmetros do espermograma ao longo dos anos foi analisada através do teste ANOVA. Posteriormente, foi realizado o teste *Post Hoc de Turkey*, de forma a determinar entre que anos existiam diferenças significativas das médias.

Todos os gráficos representam os respectivos valores médios, e as barras de erro representam o erro padrão associado, salvo indicação do contrário.

# Resultados

## Descrição sociodemográfica

Até Dezembro de 2018 existia um total de 267 indivíduos inscritos no Banco Público de Gâmetas. Destes, 21 foram excluídos da análise estatística por não apresentarem valores de espermograma (excluídos *à priori* por avaliação da história clínica insatisfatória ou por desistência). Foram também excluídos 20 indivíduos que estavam inscritos nos centros afiliados do BPG de Coimbra e Lisboa, de forma a minimizar os vieses associados à forma como é conduzida a entrevista. Ficou-se, assim, com uma amostra de 226 indivíduos no total.

A idade dos candidatos a dadores variou entre os 18 e os 40 anos, uma vez que é o intervalo de idade entre o qual é possível fazer a doação de gâmetas masculinos em Portugal, no BPG. Assim, a amostra estudada apresentava uma idade média de 27 anos (Tabela IV). Contudo, a grande maioria dos dadores encontrava-se na faixa etária abaixo dos 30 anos. A amostra apresenta uma distribuição normal do valor de IMC, com uma média de 23,7 kg/m<sup>2</sup>.

Quanto ao estado civil, a grande maioria dos candidatos a dadores de espermatozoides incluídos na amostra eram solteiros (77,9%), sendo que cerca de 55% eram estudantes (incluindo ensino secundário, profissional e universitário). Na Tabela IV encontram-se listadas as diversas situações profissionais de acordo com a Classificação Portuguesa de Profissões<sup>50</sup>.

Como factores de risco para a redução da fertilidade masculina, foram analisados os consumos de álcool, tabaco e drogas (Tabela IV). Considerando o consumo de álcool, os dados inscritos na base de dados do BPG encontravam-se codificados sob a forma de “Sim”, “Não”, “Sim socialmente” e “Sim às refeições”. De forma a garantir a homogeneidade de resultados, estas categorias foram agrupadas em “Sim” e “Não”, conforme consumiam álcool actualmente (“Sim”, “Sim socialmente” e “Sim às refeições”) ou não, respectivamente. Desta forma, 56,2% da amostra referiu algum tipo de consumo de álcool (Tabela IV).

Da mesma forma, o consumo de tabaco encontrava-se codificado na base de dados do BPG como “Sim”, “Não”, “Sim socialmente” e “Antecedentes de tabagismo”, pelo que foram criados dois novos grupos, considerando o consumo actual de tabaco. Assim, considerou-se como “Sim” o consumo de tabaco e o consumo social, e como “Não” a ausência de consumo de tabaco e os antecedentes de tabaco. De acordo com esta reclassificação, 19,9% dos candidatos a dadores referiam algum tipo de consumo de tabaco no presente (Tabela IV).

Por último, o consumo de estupefacientes foi o parâmetro que apresentou maior variabilidade na base de dados do BPG, existindo várias classificações (“Sim”, “Não”, “Sim - charro de vez em quando”, “Sim - socialmente”, “Sim - haxixe”, “Não desde há 3 anos”, “Não desde há 1 ano (haxixe)” e “No passado”). De forma a homogeneizar os vários critérios, o consumo de drogas foi também reclassificado em “Sim” e “Não” de acordo com a existência ou não de consumo actualmente. Desta forma, verificou-se que menos de 9% dos indivíduos referiam consumo actual de drogas.

*Tabela IV - Descrição sociodemográfica da amostra de candidatos a dadores de gâmetas*

Idade média ( $\pm$ SEM), anos	27	( $\pm$ 0,35)
IMC médio ( $\pm$ SEM), Kg/m <sup>2</sup>	23,7	( $\pm$ 0,19)
Estado Civil, n (%)		
Solteiro	176	(77,9)
Casado	23	(10,2)
Outro*	27	(11,9)
Situação Profissional, n (%) **		
Estudante	124	(54,9)
Empregado		
Profissões das Forças Armadas	6	(2,7)
Representantes do poder legislativo e de órgãos executivos, dirigentes, directores e gestores executivos	4	(1,8)
Especialistas das actividades intelectuais e científicas	28	(12,4)
Técnicos e profissões de nível intermédio	14	(6,2)
Pessoal administrativo	4	(1,8)
Trabalhadores dos serviços pessoais, de protecção e segurança e vendedores	9	(4,0)
Trabalhadores qualificados da indústria, construção e artífices	8	(3,5)
Operadores de instalações e máquinas e trabalhadores da montagem	3	(1,3)
Trabalhadores não qualificados	3	(1,3)
Desempregado	14	(6,2)
Factores de Risco, n (%)		
Consumo de Álcool	127	(56,2)
Consumo de Tabaco	45	(19,9)
Consumo de Drogas	20	(8,8)

\*Outro: União de facto, divorciado, não definido

\*\* 9 valores omissos



## Avaliação do espermograma da amostra de candidatos a dadores

Todos os indivíduos da amostra fizeram pelo menos um espermograma, para avaliar a sua elegibilidade como dadores de gâmetas, mas apenas o primeiro espermograma foi utilizado para o estudo (espermograma principal). Os valores médios de cada parâmetro do espermograma (volume, pH, motilidade progressiva, concentração, morfologia normal e número de leucócitos) encontram-se na Tabela V.

Dos 226 indivíduos, 66,1% apresentavam normozoospermia de acordo com os critérios da WHO, ou seja, não apresentavam qualquer parâmetro espermático fora dos valores de referência. Ao avaliar os vários parâmetros do espermograma, identificaram-se os seguintes diagnósticos: 8,4% de indivíduos com oligozoospermia (n=19), 9,7% com astenozoospermia (n=22), 23,9% com teratozoospermia (n=54), 3,1% com oligoastenoteratozoospermia (n=7), 5,3% com oligoteratozoospermia (n=12), e 4,9% com astenoteratozoospermia (n=11).

Tabela V - Avaliação do espermograma principal da amostra de dadores

Parâmetros do espermograma	Média ± SEM	Valores de Referência WHO	Indivíduos com valores fora do normal, % (n)
Volume (mL)	3,1 ± 0,11	≥ 1,5	11,9 (27)
pH <sup>a</sup>	8,0 ± 0,02	≥ 7,2	0,4 (1)
Motilidade Progressiva (%)	54,1 ± 1,06	≥ 32	9,7 (22)
Concentração (*10 <sup>6</sup> /mL)	81,5 ± 4,28	≥ 15	8,4 (19)
Morfologia Normal (%) <sup>b</sup>	7,4 ± 0,25	≥ 4	23,9 (54)
Leucócitos (*10 <sup>6</sup> /mL)	0,5 ± 0,16	≤ 1	5,8 (13)

<sup>a</sup> 4 valores omissos

<sup>b</sup> 1 valor omissos

Foi ainda analisada a evolução de cada um dos parâmetros do espermograma ao longo dos anos. Verificou-se que os parâmetros de Concentração e Morfologia Normal apresentavam diferenças estatisticamente significativas entre alguns anos. Desta forma, verificou-se uma diminuição do valor médio da concentração de espermatozoides no ejaculado no ano de 2017 (61,27±7,27) em comparação com o ano de 2018 (111,53±12,11, p=0,014) (Figura 7).

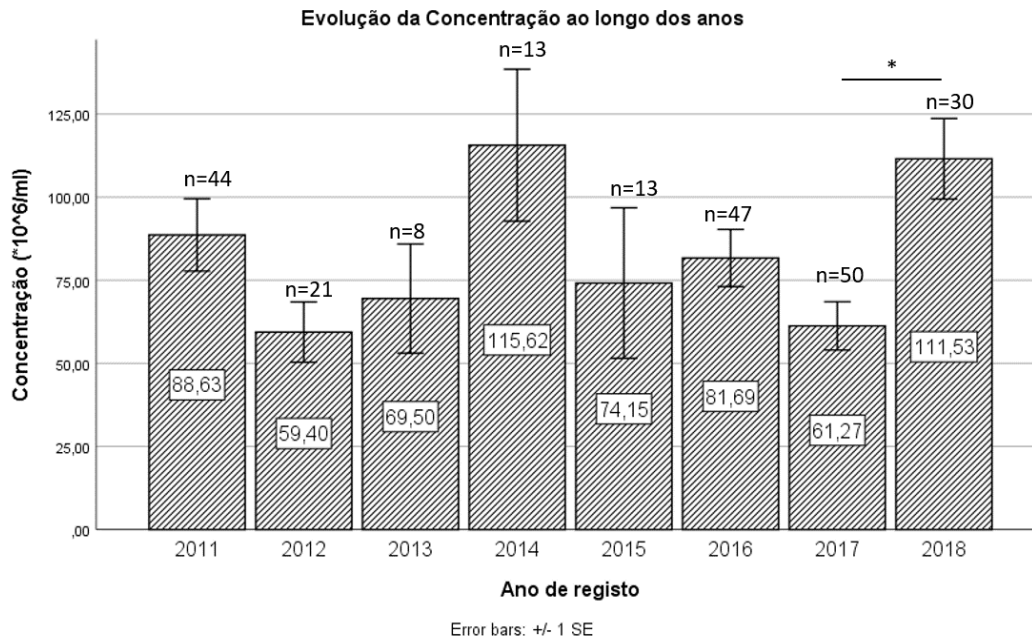


Figura 7 - Evolução da Concentração de espermatozoides no ejaculado ao longo dos anos; \* $p < 0,05$

Quanto à Morfologia Normal, observou-se uma diminuição progressiva deste parâmetro, desde 2011 até 2018, existindo uma diferença significativa entre os valores médios no ano de 2011 ( $8,85 \pm 0,70$ ) e 2017 ( $6,47 \pm 0,53$ ) e entre 2011 e 2018 ( $6,13 \pm 0,41$ ) (Figura 8), correspondendo a uma redução de 26,89% e 30,73%, respectivamente.

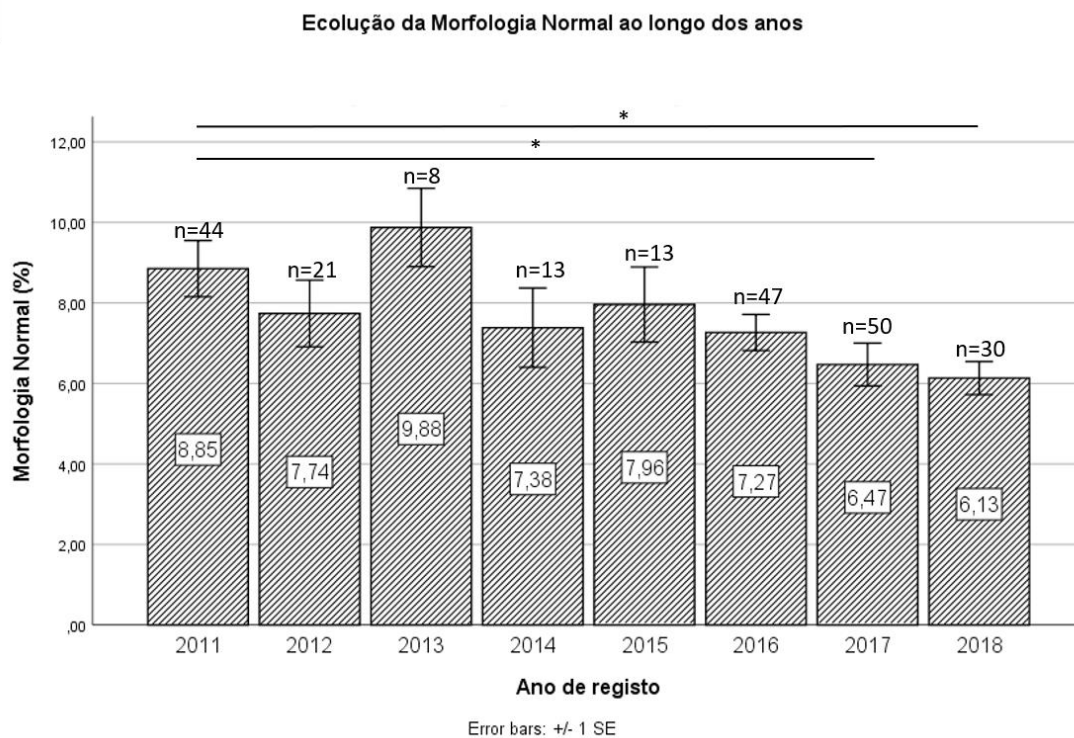


Figura 8 - Evolução da Morfologia Normal dos espermatozoides ao longo dos anos; \* $p < 0,05$

## Relação entre os valores do espermograma e os factores sociodemográficos e os factores de risco

Uma vez que cerca de metade dos indivíduos da amostra se encontravam na faixa etária abaixo dos 25 anos (48,7%), esta idade foi utilizada com *cut-off* para a restante análise estatística (Tabela VI). Assim, avaliando os vários parâmetros do espermograma, verificou-se uma diferença estatisticamente significativa no que diz respeito à percentagem de espermatozoides com morfologia normal. O grupo de indivíduos com idade igual ou inferior a 25 anos apresentou uma média de 6,9% ( $\pm 0,34$ ) de espermatozoides com morfologia normal, enquanto que os indivíduos mais velhos apresentavam uma média de 7,9% ( $\pm 0,35$ ) de espermatozoides normais (Figura 9 A). Não se verificaram diferenças estatísticas nos restantes parâmetros avaliados.

A amostra foi subdividida em duas categorias de acordo com o IMC, permitindo classificar os potenciais dadores em “IMC Normal” (IMC  $<25 \text{ kg/m}^2$ ) ou “Excesso de peso/Obesidade” (IMC  $\geq 25 \text{ kg/m}^2$ ) (Tabela VI). Verificou-se que os indivíduos com excesso de peso/obesidade apresentavam uma motilidade progressiva média inferior ( $50,7 \pm 2,14$ ) aos que têm um IMC normal ( $55,5 \pm 1,20$ ) (Figura 9 B).

Tabela VI - Comparação dos valores médios de cada parâmetro do espermograma tendo em conta os factores sociodemográficos

	Factores Socio-demográficos					
	Idade			IMC, $\text{kg/m}^2$		
	$\leq 25$ (n=110)	$> 25$ (n=116)	p	$< 25$ (n=159)	$\geq 25$ (n=67)	p
<b>Volume (mL)</b>	3,1 $\pm$ 0,15	3,2 $\pm$ 0,15	0,492	3,2 $\pm$ 0,13	3,0 $\pm$ 0,18	0,336
<b>pH<sup>a</sup></b>	8,1 $\pm$ 0,03	8,0 $\pm$ 0,03	0,189	8,0 $\pm$ 0,02	8,1 $\pm$ 0,03	0,530
<b>Motilidade Progressiva (%)</b>	52,8 $\pm$ 1,56	55,3 $\pm$ 1,45	0,250	55,5 $\pm$ 1,20	50,7 $\pm$ 2,14	<b>0,036</b>
<b>Concentração (*10<sup>6</sup>/mL)</b>	79,2 $\pm$ 5,63	83,7 $\pm$ 6,41	0,601	80,4 $\pm$ 4,82	84,0 $\pm$ 8,84	0,704
<b>Morfologia Normal (%)<sup>b</sup></b>	6,9 $\pm$ 0,34	7,9 $\pm$ 0,35	<b>0,034</b>	7,4 $\pm$ 0,28	7,4 $\pm$ 0,49	0,974
<b>Leucócitos (*10<sup>6</sup>/mL)</b>	0,3 $\pm$ 0,09	0,7 $\pm$ 0,30	0,197	0,4 $\pm$ 0,16	0,6 $\pm$ 0,40	0,595

<sup>a</sup> 4 valores omissos: 2 com  $\leq 25$  anos e 2 com  $> 25$  anos; 3 com IMC  $< 25 \text{ kg/m}^2$  e 1 com IMC  $\geq 25 \text{ kg/m}^2$ .

<sup>b</sup> 1 valor omissos: 1 com  $> 25$  anos; 1 com IMC  $< 25 \text{ kg/m}^2$ .

Independent T-test

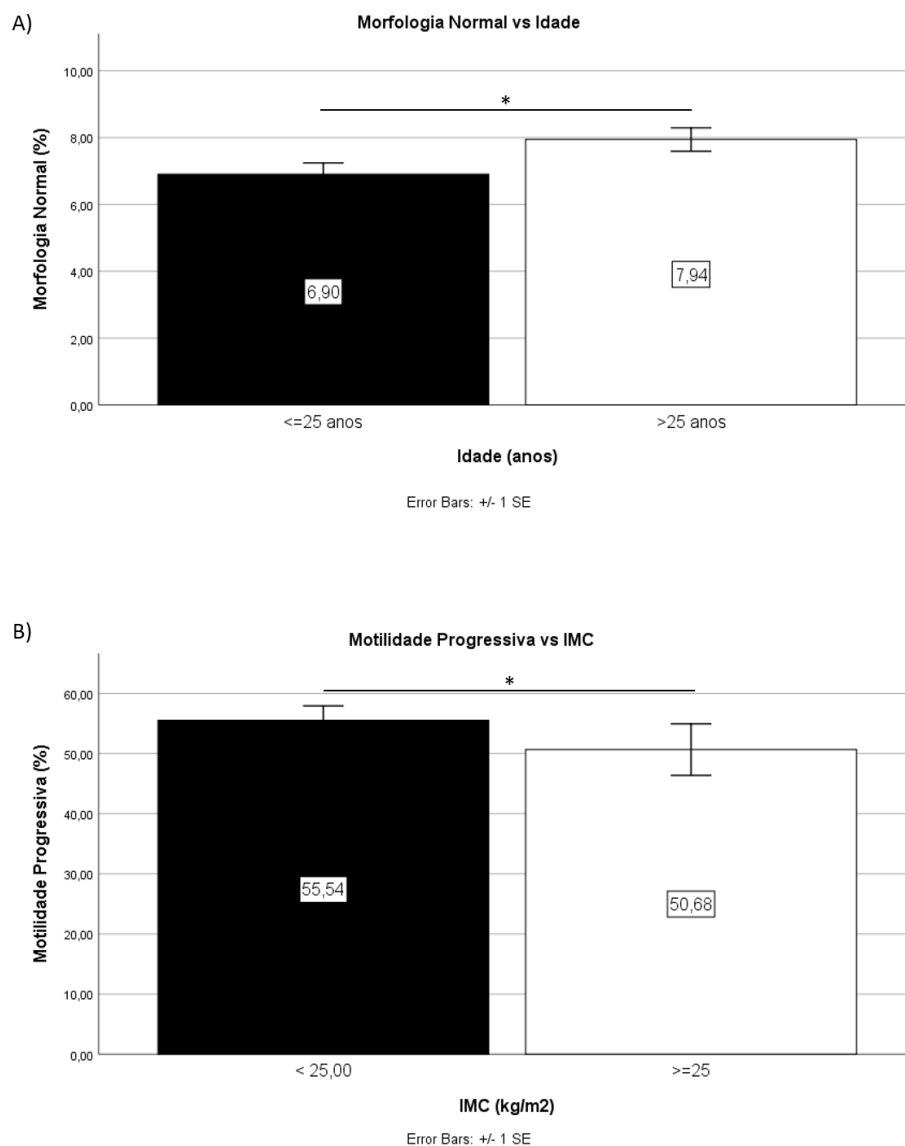


Figura 9 - Valores médios de Morfologia Normal em função da idade e da Motilidade Progressiva em função do IMC; \* $p < 0,05$

Foram considerados como factores de risco para alterações dos parâmetros do espermograma o consumo de tabaco, álcool e drogas (Tabela VII). Assim, verificou-se que a maioria dos candidatos a dadores não consomem tabaco nem drogas. Contudo, mais de metade dos indivíduos afirmou consumir álcool regularmente (às refeições ou socialmente). Importa salientar que na base de dados do BPG não existe informação quanto à quantidade de grama de álcool ingeridas por dia, o que seria uma informação pertinente a avaliar. No que diz respeito ao consumo de tabaco, verificou-se uma diferença estatisticamente significativa no número de leucócitos presentes no ejaculado de fumadores e não fumadores. Na amostra, os candidatos a dadores que eram fumadores apresentaram uma média de 0,1 ( $\pm 0,05$ ) milhões de leucócitos por mililitro, comparado com 0,6 ( $\pm 0,20$ ) milhões de leucócitos por mililitro nos não fumadores

(Figura 10), sendo a idade média em cada um destes grupos de 26,2 e 26,8 anos, respectivamente. No entanto, não se verificaram diferenças estatísticas em nenhum dos parâmetros do espermograma entre os indivíduos que têm como factores de risco o consumo de álcool ou drogas, e os que não têm (Tabela VII).

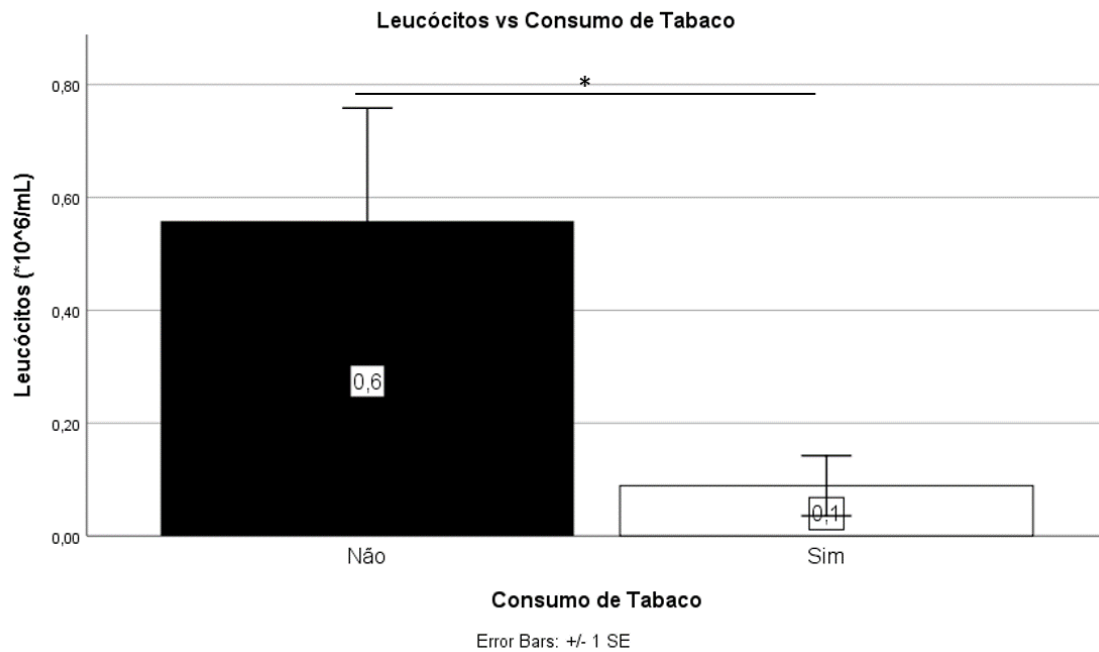


Figura 10 – Valor médio de leucócitos presentes no ejaculado em função do consumo de tabaco; \* $p < 0,05$

Tabela VII - Comparação dos valores médios de cada parâmetro do espermograma tendo em conta o consumo de tabaco, álcool e drogas

	Factores de Risco								
	Tabaco			Álcool			Drogas		
	Sim (n=45)	Não (n=181)	P	Sim (n=127)	Não (n=99)	P	Sim (n=20)	Não (n=206)	P
<b>Volume (mL)</b>	3,2 ± 0,28	3,1 ± 0,11	0,840	3,1 ± 0,14	3,14 ± 0,16	0,965	2,9 ± 0,35	3,2 ± 0,11	0,571
<b>pH<sup>a</sup></b>	8,0 ± 0,04	8,0 ± 0,02	0,894	8,0 ± 0,03	8,0 ± 0,03	0,599	7,94 ± 0,10	8,0 ± 0,02	0,315
<b>Motilidade Progressiva (%)</b>	53,8 ± 2,16	54,2 ± 1,22	0,880	54,1 ± 1,40	54,0 ± 1,64	0,962	53,5 ± 4,23	54,2 ± 1,09	0,871
<b>Concentração (*10<sup>6</sup>/mL)</b>	82,2 ± 9,07	81,3 ± 4,85	0,936	80,8 ± 5,77	82,4 ± 6,40	0,858	80,2 ± 13,69	81,6 ± 4,51	0,928
<b>Morfologia Normal (%)<sup>b</sup></b>	8,0 ± 0,66	7,3 ± 0,26	0,288	7,8 ± 0,33	7,0 ± 0,37	0,093	6,8 ± 0,90	7,5 ± 0,25	0,438
<b>Leucócitos (*10<sup>6</sup>/mL)</b>	0,1 ± 0,05	0,6 ± 0,20	<b>0,025</b>	0,3 ± 0,10	0,72 ± 0,34	0,196	0,4 ± 0,31	0,4 ± 0,17	0,901

<sup>a</sup> 4 valores omissos: 1 fumador e 3 não fumadores; 2 consumidores de álcool e 2 não consumidores de álcool; 4 não consumidores de drogas.

<sup>b</sup> 1 valor omissos: 1 fumador; 1 consumidor de álcool; 1 não consumidor de drogas.

Independent T-test

## Efeito dos factores sociodemográficos e dos factores de risco nos parâmetros do espermograma

Foi realizada uma avaliação ANOVA para controlar o efeito dos vários factores sociodemográficos (Idade e IMC) e de risco (consumo de tabaco, álcool e drogas), bem como as suas interações, nos diferentes parâmetros avaliados pelo espermograma.

Ao avaliar o pH da amostra, verificou-se que o consumo de drogas tem influencia no valor deste parâmetro [F (1, 201)= 6,823, p= 0,010]. Assim, observou-se que o consumo de drogas leva a uma diminuição do pH de  $8,09 \pm 0,031$  nos indivíduos que não consomem, para  $7,86 \pm 0,082$  naqueles que consomem. Ainda assim, o valor de pH manteve-se acima do valor normal para a população ( $pH \geq 7,2$ ) (Figura 11).

Quanto aos restantes parâmetros do espermograma, nomeadamente Motilidade Progressiva, Concentração e Número de Leucócitos, não se verificaram interações significativas entre os vários factores testados. Quanto ao Volume do ejaculado e à percentagem de espermatozoides com Morfologia Normal, apesar de se verificarem interações com alguns dos factores sociodemográficos e de risco avaliados, estes resultados não são estatisticamente significativos nem biologicamente representativos, uma vez que resultam da análise entre grupos com um número reduzido de indivíduos (Apêndice 1).

Foi ainda avaliada a influência do número de cigarros consumidos sobre cada um dos parâmetros do espermograma, não se objectivando qualquer correlação (Tabela VIII).

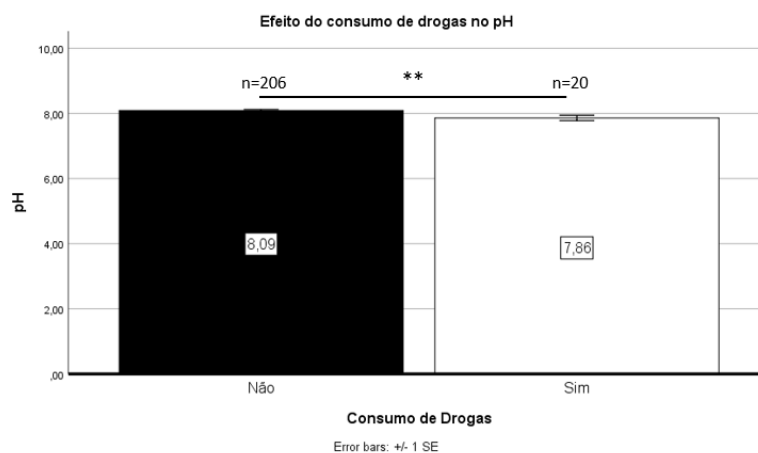


Figura 11 - Efeito do consumo de drogas no pH da amostra; \*\* $p \leq 0,01$

Por último, e de forma a prever o comportamento de cada um dos parâmetros do espermograma em função dos factores sociodemográficos e de risco anteriormente analisados, foi realizada uma avaliação estatística através de regressão linear. Contudo, não se verificou uma regressão linear estatisticamente significativa para nenhum dos parâmetros ( $0,02 < R^2 < 0,045$ ).

Tabela VIII - Influência do número de cigarros consumidos sobre cada um dos parâmetros do espermograma, na amostra total de dadores

Parâmetros espermograma	Análise ANOVA
Volume	F (1, 213) = 0,445; p = 0,505
pH	F (1, 209) = 0,139; p = 0,710
Concentração	F (1, 213) = 0,534; p = 0,466
Motilidade Progressiva	F (1, 213) = 0,784; p = 0,377
Morfologia Normal	F (1, 212) = 0,293; p = 0,589
Leucócitos	F (1, 213) = 0,486; p = 0,487

## Avaliação dos indivíduos com espermogramas anormais

Na amostra avaliada, cerca de um terço dos indivíduos (33,93%) apresentava pelo menos um parâmetro de espermograma fora dos valores determinado pela WHO como normais (Figura 12).

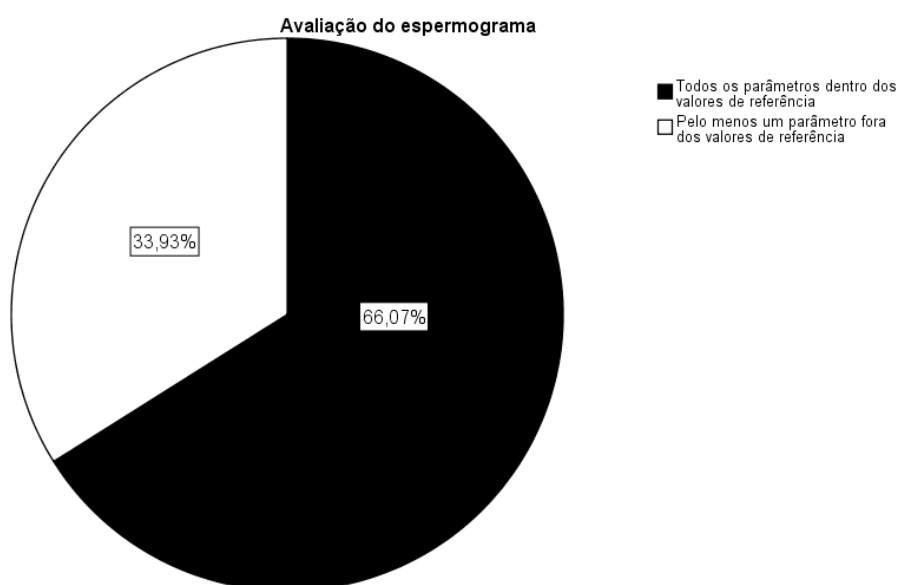


Figura 12 - Distribuição dos indivíduos de acordo com a avaliação do espermograma



Considerando apenas os indivíduos com um espermograma alterado, verificou-se ainda que a grande maioria dos indivíduos (68,49%) apresentava apenas um parâmetro fora dos valores de normalidade (Figura 13), sendo a morfologia o parâmetro mais vezes alterado (Tabela IX).

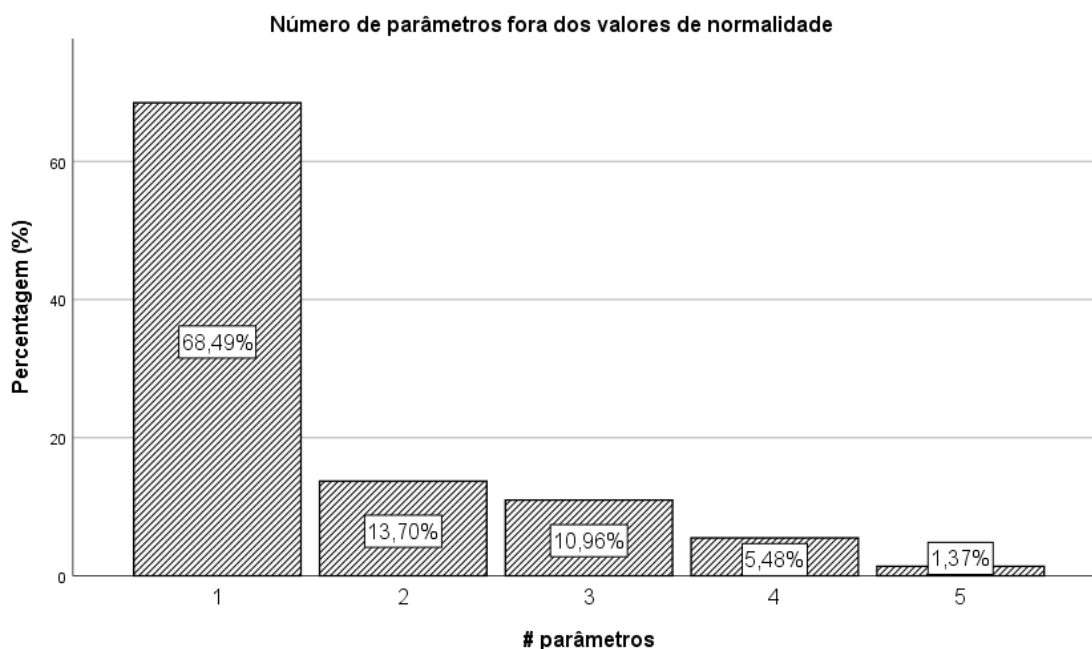


Figura 13 - Número de parâmetros fora dos valores de normalidade, considerando os indivíduos não normozoospermicos

Tabela IX - Percentagem de indivíduos com alterações em cada parâmetro do espermograma

Variáveis do espermograma	% de indivíduos com alterações
Volume	35,5
pH	1,3
Concentração	25,0
Motilidade Progressiva	28,9
Morfologia Normal	57,9
Leucócitos	17,1

A avaliação estatística pelo método ANOVA foi repetida, utilizando os mesmos critérios, mas considerando apenas os indivíduos que tinham pelo menos um parâmetro do espermograma alterado e excluindo os indivíduos com normozoospermia.

Ao analisar a percentagem de espermatozoides com Formas Normais, verificou-se que este parâmetro é influenciado pela idade [F(1, 58)=7,010, p=0,010]. Na amostra, os indivíduos com idade igual ou inferior a 25 anos apresentavam em média uma percentagem de espermatozoides com formas normais inferior ao valor considerado como normal para a

população ( $3,46 \pm 0,707$ ), sendo a diferença significativa face à média dos indivíduos com mais de 25 anos ( $7,78 \pm 0,767$ ) (Figura 14). Não existem diferenças entre os dois grupos quanto ao consumo de factores de risco.

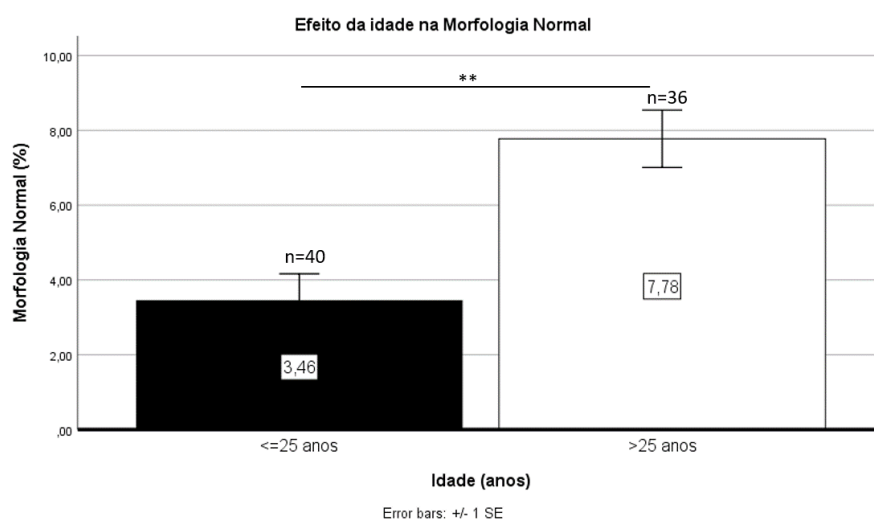


Figura 14 - Efeito da idade na morfologia normal, nos indivíduos não normozoospermicos;  $**p < 0,01$

Não se verificaram interações entre os vários factores sociodemográficos e de risco nos restantes parâmetros do espermograma. A ausência de diferenças biologicamente significativas pode, em parte, estar relacionada com o facto de, ao se fazer uma sucessiva subdivisão da amostra, cada grupo ficar com um número muito reduzido de indivíduos (em alguns casos apenas 1 ou 2 indivíduos), o que não permite retirar conclusões (Apêndice 2). Foi também analisado o efeito do número de cigarros consumidos por dia sobre cada um dos parâmetros do espermograma, não se tendo verificado qualquer tipo de influência na amostra (Tabela X).

Tabela X - Influência do número de cigarros consumidos sobre cada um dos parâmetros do espermograma, nos dados com pelo menos um parâmetro anormal

Parâmetros espermograma	Análise ANOVA
<b>Volume</b>	F (1, 72) = 1,002; p = 0,320
<b>pH</b>	F (1, 69) = 0,854; p = 0,359
<b>Concentração</b>	F (1, 72) = 0,318; p = 0,575
<b>Motilidade Progressiva</b>	F (1, 72) = 0,005; p = 0,943
<b>Morfologia Normal</b>	F (1, 72) = 2,233; p = 0,139
<b>Leucócitos</b>	F (1, 72) = 0,649; p = 0,423

# Discussão

O sucesso da fertilização, quer natural quer através de métodos de procriação medicamente assistida, está intimamente relacionado com as características dos gâmetas masculinos e femininos. Neste sentido, os potenciais dadores inscritos no BPG foram utilizados como amostra da população portuguesa masculina, de forma a ser possível estudar a qualidade espermática e determinar qual o efeito dos vários factores sociodemográficos e de risco sobre os parâmetros do espermograma.

A amostra estudada apresentava uma idade média de 27 anos, sendo formada essencialmente por estudantes do ensino secundário, universitário e profissional, com um IMC médio normal. Quanto aos factores de risco analisados, verificou-se que mais de metade da amostra apresentava algum tipo de consumo de álcool aquando da recolha dos gâmetas, quase um quarto da amostra apresentava tabagismo activo e menos de um décimo referiu consumo actual de drogas.

Na amostra avaliada verificou-se que as principais anomalias espermáticas encontradas, por ordem decrescente de prevalência, eram a teratozoospermia, a astenozoospermia e a oligozoospermia. Estes resultados são semelhantes aos encontrados por Ombelet *et al.*, que conduziram um estudo numa clínica de fertilidade na Bélgica, onde avaliaram os parceiros de mulheres com anovulação crónica<sup>51</sup>. Estudos como estes revestem-se de particular interesse, uma vez que permitem aferir, ainda que de uma forma indirecta, qual a prevalência de anomalias nos espermatozoides da população em geral. Particularizando para o estudo realizado no BPG, tal adquire uma especial importância, dado que quase um quarto da amostra apresentava teratozoospermia, ou seja, existia uma elevada prevalência de espermatozoides com formas anormais, o que irá comprometer a eficácia da fecundação, quer *in vivo* como *in vitro*. Existem estudos que demonstram uma correlação positiva significativa entre a percentagem de espermatozoides com formas normais e o índice de fertilização. Esta variação deve-se ao facto de apenas alguns dos espermatozoides com formas normais serem capazes de sofrer a reacção acrossomal e, conseqüentemente, serem capazes de se fundir com o oócito<sup>52</sup>.

Desde o início da década de 70 que se tem vindo a investigar se existe uma tendência para a diminuição da qualidade espermática. Neste âmbito, Swan *et al.* identificaram uma diminuição de cerca de 50% da concentração espermática na segunda metade do século XX, com particular ênfase para os Estados Unidos da América, Europa e Austrália. Neste período de tempo, verificou-se um declínio de cerca de 3% por ano deste parâmetro<sup>53</sup>. Previamente, Carlsen *et al.*

tinham já demonstrado uma diminuição do número de espermatozoides, bem como do volume de ejaculado, entre o período de 1938 e 1991<sup>54</sup>. Também numa meta-análise realizada com base em artigos publicados entre 1965 e 2015, Sengupta *et al.* demonstraram uma diminuição da concentração de espermatozoides na população masculina europeia<sup>55</sup>. No estudo realizado no BPG, verificou-se que tanto a Concentração como a Morfologia Normal dos espermatozoides na amostra variaram significativamente ao longo dos anos. No que diz respeito à Concentração, apesar de não parecer haver uma tendência clara em relação ao seu declínio ao longo dos anos, existe uma diminuição significativa do seu valor médio nos indivíduos que se registaram no BPG no ano de 2017, quando comparado com os que se inscreveram em 2018. Importa salientar que o número de indivíduos inscritos por ano entre 2012 e 2015 é reduzido, quando comparado com o restante período de tempo em estudo, o que leva simultaneamente a que o erro padrão seja superior nestes anos. Este motivo poderá explicar a ausência de variação significativa neste intervalo de tempo. Por outro lado, ao analisar a percentagem de espermatozoides com Morfologia Normal na amostra, verificou-se uma clara tendência da redução dos valores deste parâmetro ao longo dos anos. Assim, no estudo aqui realizado, observou-se uma redução significativa da percentagem de espermatozoides com formas normais entre o ano de 2011 e os anos de 2017 e 2018, correspondendo a uma redução de 26,89% e 30,73%, respectivamente. Estes resultados estão em linha com o reportado por van den Hoven *et al.*, que demonstraram que entre 1986 e 2011 ocorreu uma diminuição dos valores de espermatozoides morfológicamente normais, num estudo realizado na cidade de Nimega, na Holanda. No referido estudo, observaram uma diminuição de 30-80% para 0-10% de espermatozoides com formas normais no final do estudo, entre 2004 e 2011<sup>56</sup>. Resultados semelhantes foram obtidos por Splingart *et al.*, num estudo realizado numa amostra de dadores de gâmetas masculinos, na região de Tours, em França, entre 1976 e 2009<sup>57</sup>. Uma vez que o estudo realizado no BPG é relativo a um intervalo temporal subsequente ao estudado por van den Hoven *et al.* e por Splingart *et al.*, poderemos estar perante novas evidências da continuação do declínio da percentagem de espermatozoide com formas normais no ejaculado de candidatos a dadores de gâmetas masculinos. Todavia, importa salientar que os vários estudos aqui referidos foram realizados com base em populações distintas. Contudo, não existem estudos baseados na população portuguesa, o que seria importante para, por um lado confirmar se os dados aqui obtidos são representativos da população, e por outro para determinar se este padrão de redução de alguns dos parâmetros do espermograma representa uma tendência mais antiga.

O efeito da idade materna no sucesso da fertilização e reprodução é extensamente reconhecido. Contudo, no que toca ao género masculino, não existe um conceito definido de

“idade paterna avançada”. Stone *et al.* estudaram o efeito da idade sobre vários parâmetros do espermograma e concluíram que, até aos 34 anos, não existiam variações em nenhum dos parâmetros. Contudo, a partir dos 34 anos, verificaram uma diminuição do número total de espermatozoides, a partir dos 40 anos uma diminuição dos valores de concentração e de morfologia normal e a partir dos 45 anos uma diminuição do volume de ejaculado<sup>58</sup>. Numa revisão da literatura realizada por Kidd *et al.*, vários artigos evidenciaram a diminuição da percentagem de espermatozoides com morfologia normal entre os 30 e os 50 anos<sup>59</sup>. Também no Brasil, Oliveira *et al.* correlacionaram o aumento da idade com a diminuição da percentagem de formas normais, da motilidade progressiva e da vitalidade espermática, bem como com o aumento da fragmentação do DNA dos espermatozoides<sup>60</sup>. Mas, ao contrário do que seria de esperar, numa primeira análise do trabalho realizado no BPG, verificou-se que os indivíduos mais jovens da amostra, com idade inferior a 25 anos, apresentavam em média menos espermatozoides com morfologia normal, quando comparados com a faixa etária entre os 26 a 40 anos, não tendo sido identificadas variações nos restantes parâmetros do espermograma. No entanto, importa salientar que estes resultados não foram controlados para os factores de risco nem para o número de dias de abstinência. De facto, quando controlado para os factores de risco, esta variação deixou de se observar. Contudo, o número de dias de abstinência é um factor confundidor importante, conforme demonstrado por Auger *et al.*<sup>61</sup>. Apesar de presente na base de dados do BPG, este dado não se encontra sistematicamente preenchido, pelo que não é possível utilizá-lo para controlar os restantes parâmetros. Além disso, importa referir que os artigos presentes na literatura utilizam como *cut-off* para a idade os 35 anos, enquanto que no estudo aqui apresentado foi utilizada a idade de 25 anos. A opção em utilizar como *cut-off* esta idade prendeu-se com o facto de os dadores terem entre 18 e 40 anos. Como tal, se se utilizasse uma idade superior como *cut-off*, os grupos de indivíduos ficariam com tamanhos muito dispare, o que não permitiria uma análise estatística tão precisa. Importa também referir que, em Portugal, todos os estudos realizados têm como objectivo o estudo da idade materna aquando do nascimento do primeiro filho, não existindo referência à idade paterna. De acordo com a PORDATA, em Portugal, desde meados da década de 80 que a idade média materna aquando do nascimento do primeiro filho aumentou de 23,6 anos em 1985 para 30,3 anos em 2017<sup>62</sup>. Ainda assim, seria interessante ter conhecimento da idade paterna aquando da concepção, de forma a compreender se esta estaria associada a um risco superior de alterações do espermograma e, consequentemente, a uma maior dificuldade reprodutiva.

Neste trabalho, realizado no BPG, demonstrou-se ainda uma diminuição da motilidade progressiva média com o aumento do IMC. Este resultado está de acordo com estudos recentes

de Belan *et al.* e de Bieniek *et al.*, que demonstraram uma correlação negativa entre estes dois parâmetros. De facto, Belan *et al.* demonstraram não só uma diminuição da motilidade progressiva mas também do número total de espermatozoides no ejaculado, enquanto Bieniek *et al.* demonstraram uma correlação negativa entre o IMC e o volume, concentração, motilidade e morfologia dos espermatozoides<sup>63,64</sup>. Campbell *et al.* tinham já em 2015, através de uma meta-análise, identificado uma correlação negativa entre o IMC e a motilidade progressiva<sup>65</sup>. O excesso de peso/obesidade tomam especial relevância uma vez que, de acordo com dados da Direção-Geral da Saúde (DGS), se verificou um aumento progressivo destes parâmetros na população portuguesa, entre 1960 e 1990. Estes dados resultam do único estudo à cerca da evolução da obesidade em Portugal, realizado em inspeções militares e tendo como alvo rapazes com 20 anos de idade<sup>66</sup>. Ainda assim, demonstram a importância da implementação de medidas que permitam reduzir o excesso de peso/obesidade, não só pelo risco metabólico e cardiovascular associado, mas também devido ao impacto negativo sobre a saúde reprodutiva masculina. Mais ainda, Samavat *et al.* objectivaram uma tendência (não estatisticamente significativa) para o aumento dos parâmetros de motilidade progressiva e número total de espermatozoides em homens obesos submetidos a cirurgia bariátrica, e um aumento significativo no volume e viabilidade das amostras, quando observados 6 meses após a intervenção. Demonstraram ainda um aumento de hormonas sexuais como a FSH, LH e testosterona total e *sex hormone binding globulin*, bem como a diminuição dos níveis de estradiol e do número de indivíduos com hipogonadismo<sup>67</sup>.

De acordo com a literatura, o consumo de tabaco deverá ter um efeito negativo sobre os vários parâmetros do espermograma, uma vez que o consumo de tabaco provoca um aumento dos níveis de espécies reactivas de oxigénio, com conseqüente aumento do *stress* oxidativo. Neste sentido, existem evidências de que o tabagismo contribuirá para a diminuição do volume, motilidade progressiva, espermatozoides com formas normais e viabilidade, com aumento do número de espermatozoides imóveis e de leucócitos presentes no ejaculado<sup>68,69</sup>. Noutro estudo realizado por Trummer *et al.*, apenas foram identificadas diferenças entre fumadores e não fumadores ao nível do número de leucócitos presentes no ejaculado<sup>70</sup>. Ainda assim, a Sociedade Americana para a Medicina Reprodutiva emitiu, em 2018, uma opinião onde refere que o efeito do tabaco na fertilidade masculina é difícil de discernir, uma vez que, apesar de se verificar uma diminuição de vários parâmetros conforme anteriormente descrito, estes mantêm-se dentro dos limites da normalidade<sup>71</sup>. Contudo, na amostra avaliada neste trabalho, verificou-se uma relação inversa entre o consumo de tabaco e a presença de leucócitos no ejaculado, não se verificando variações significativas para os valores de mais nenhum parâmetro do

espermograma. Todavia, importa salientar que os estudos presentes na literatura utilizam como população de estudo indivíduos que recorreram a clínicas de procriação medicamente assistida, devido a infertilidade, não sendo descrito se se tratavam de casos de infertilidade feminina ou masculina, o que poderá surgir como um viés de seleção dos participantes. No estudo apresentado, a utilização de candidatos a dadores de gâmetas masculinos como amostra da população permite diminuir o viés de seleção, uma vez que, à partida, se tratará de uma amostra saudável. Ainda assim, seria expectável um aumento do número de leucócitos no grupo de indivíduos fumadores. Esta aparente incongruência pode ser explicada pela grande variabilidade do número de leucócitos no grupo dos não fumadores. Uma vez que se tratava de um grupo com mais indivíduos, existe inerentemente uma maior variabilidade, que poderá estar associada à própria variabilidade individual ou mesmo a factores sistémicos não controlados no estudo, como por exemplo patologia infecciosa. Em particular, a existência de patologia infecciosa não foi utilizada para controlar as análises estatísticas uma vez que os candidatos a dadores que foram excluídos *à priori* por não apresentarem valores de espermograma principal de acordo com os valores exigidos pelo BPG, não foram avaliados para as várias patologias infecciosas. Por outro lado, o grupo dos fumadores era mais reduzido e apresentava uma menor variação, o que poderá contribuir para a existência de diferenças estatisticamente significativas.

O tabagismo não é o único factor de risco para a diminuição da qualidade espermática. Tanto o consumo de álcool como o consumo de drogas estão associados a variações nos parâmetros do espermograma, com diminuição do volume, número total de espermatozoides, motilidade e células normais, sendo que o consumo crónico e pesado de álcool tem maior relevo para estes efeitos. Por outro lado, o consumo moderado de álcool não parece ter o mesmo impacto. Para além do efeito nos parâmetros espermáticos, verifica-se também um aumento do rácio estradiol/testosterona associado ao consumo crónico de álcool. Contudo, num estudo realizado por Lwow *et al.*, onde os indivíduos foram divididos de acordo com o consumo de álcool em dois grupos, de alto e baixo risco, não se verificaram diferenças estatisticamente significativas em nenhum dos parâmetros espermáticos<sup>26,72-74</sup>. Quanto ao consumo de drogas recreativas, como a marijuana, cocaína, ecstasy e opioides, vários autores referem um efeito negativo sobre o eixo HHG e espermatogénese, uma vez que os receptores canabinoides se encontram localizados na hipófise, células de Leydig, células de Seroi e tecido testicular. Também aqui o consumo regular apresenta maior relação com as alterações a nível biológico. Contudo, existem alguns estudos contraditórios, que não verificaram diferenças com o consumo regular de marijuana, o que poderá estar relacionado com os diferentes hábitos de consumo incluídos nos vários estudos<sup>72,75</sup>. Seria, portanto, expectável uma correlação negativa entre cada um destes factores

de risco e os vários parâmetros do espermograma. Todavia, não se verificaram diferenças significativas em nenhum parâmetro, quando comparados indivíduos com e sem consumo destes factores de risco. Um importante factor confundidor que não foi possível controlar neste estudo foi a quantidade de álcool consumida por dia, bem como a duração temporal desse mesmo consumo. O consumo de álcool era muitas vezes referido na base de dados do BPG como sendo “às refeições” ou “socialmente”, o que por si só não permite quantificar a sua magnitude. Em estudos futuros seria importante controlar esta variável através da determinação do consumo diário ou semanal de álcool. Da mesma forma, o consumo de drogas estava muitas vezes classificado em “ocasional” ou “no passado”. Mais ainda, diferentes médicos poderão inquirir sobre a exposição a factores de risco de forma diferente, o que resulta em respostas diferentes por parte dos candidatos a dadores. Por exemplo, a resposta poderá ser diferente consoante se pergunta “Consome drogas?” ou “Alguma vez consumiu drogas?” ou “Consumiu drogas recentemente?”. A própria empatia criada entre médico-dador poderá afectar a honestidade da resposta, principalmente em assuntos mais sensíveis.

As análises estatísticas até aqui discutidas comparavam os valores médios do espermograma tendo em conta apenas uma variável. No entanto, a complexidade do Ser Humano está relacionada com a interação de várias variáveis no organismo. Desta forma, é mais relevante considerar a influência que a interação entre os vários factores sociodemográficos e de risco têm sobre a qualidade espermática.

Assim, verificou-se uma diminuição significativa do pH do ejaculado associada ao consumo de drogas, quando controlado para os restantes factores discutidos, mantendo-se ainda assim com valores médios superiores ao limite inferior da normalidade para a população. A relevância destes dados prende-se com o facto de o pH do sémen ser importante quer para a viabilidade como para a mobilidade dos espermatozoides, sendo que em ambientes mais acídicos ocorre uma diminuição de ambos os parâmetros<sup>76</sup>. Contudo, não se verificaram interações entre os vários factores de risco e os restantes parâmetros do espermograma, o que poderá ser atribuído, em parte, ao número reduzido de indivíduos presentes em cada subcategoria.

No que diz respeito ao consumo de tabaco, é importante também ter em conta o número de cigarros consumidos por dia, bem como o número de anos de consumo. No estudo realizado no BPG não se verificou uma interação positiva entre o número de cigarros consumidos e o declínio dos parâmetros do espermograma. Todavia, conforme demonstrado numa meta-análise realizada por Sharma *et al.*, o volume, a contagem de espermatozoides, a sua motilidade e a sua



morfologia normal são afectadas negativamente pelo consumo moderado (10 a 20 cigarros por dia) e pesado (mais de 20 cigarros por dia) de tabaco<sup>69</sup>.

A última abordagem deste estudo passou por avaliar a interação dos vários factores sociodemográficos e de risco considerando apenas o subgrupo de indivíduos que apresentavam pelo menos uma alteração no espermograma. Com esta subcategorização da amostra, verificou-se uma redução significativa da percentagem de espermatozoides com Morfologia Normal em indivíduos com idade inferior a 25 anos, apresentando em média, valores inferiores aos considerados como normais para a população. Não se verificaram diferenças relativas à exposição a factores de risco que pudessem explicar estes dados. Mais ainda, não se verificaram outras interações estatísticas, em parte devido ao facto de se tratarem de categorias com um número reduzido de indivíduos, o que torna estas análises estatísticas bastante variáveis. Como tal, seria necessário aumentar o número de indivíduos incluídos em cada categoria para obter resultados estatísticos mais representativos e passíveis de análise estatística.

Para além do número reduzido de indivíduos constantes em algumas das categorias analisadas ao longo deste trabalho, existem outros vieses que poderão explicar a ausência de diferenças estatísticas em alguns dos parâmetros estudados ou mesmo as incongruências face à literatura. A ausência de estudos de saúde reprodutiva masculina portugueses semelhantes ao elaborado no BPG, que agora se apresenta, torna mais desafiante a comparação dos dados com os da literatura existente, uma vez que os principais estudos existentes foram realizados em grandes centros de fertilidade a nível dos Estados Unidos da América, França e países nórdicos. Por si só, as diferenças geográficas poderão estar associadas a diferentes resultados. Uma vez que até mesmo dentro do próprio país poderão existir diferenças geográficas, optou-se por incluir neste estudo apenas os potenciais dadores recrutados através do BPG - Porto. Outro viés que poderá estar a influenciar os resultados é o viés de seleção. A opção de se incluir apenas os potenciais dadores de gâmetas masculinos prende-se com o facto de, desta forma, se conseguir criar uma amostra que, à partida, terá uma variabilidade semelhante à que se pode encontrar na população portuguesa. Contudo, deve-se manter sempre em mente que se tratam de pessoas que voluntariamente doam gâmetas, ou seja, não se trata de uma amostra randomizada da população, que seria o ideal para um estudo desta natureza. Por outro lado, apesar de a doação de gâmetas se tratar de um processo livre, voluntário e não remunerado, seria também interessante compreender o que motiva estes homens a serem dadores. Apesar de não ser um processo remunerado, a lei portuguesa prevê que os dadores sejam “ressarcidos pelas despesas efetuadas ou prejuízos direta e imediatamente resultantes das suas dádivas num valor máximo de um décimo do valor do IAS em vigor”<sup>77</sup>. Não existem estudos realizados em Portugal que

avaliem as motivações dos dadores de gâmetas masculinos. No entanto, nos Estados Unidos da América, onde a realidade é bastante diferente da portuguesa, onde existe bastante publicidade em relação ao assunto, e a doação de gâmetas femininos e masculinos é remunerada, Rene Almeling verificou que a principal motivação para a doação de gâmetas masculinos era, de facto, a remuneração monetária. De acordo com o seu estudo sociológico, as agências americanas que recrutam gâmetas femininos tendem a apelar ao altruísmo, enfatizando que as mulheres estarão a ajudar casais inférteis que estão a passar por uma situação difícil, enquanto que os bancos de gâmetas masculinos encorajam os homens a ganhar dinheiro de forma fácil, através da doação de gâmetas, existindo inclusive um anúncio que refere *Get paid for what you're already doing!* ("Seja pago por aquilo que já está a fazer!")<sup>78</sup>. Sebastian Mohr refere ainda que nos Estados Unidos da América, devido à forma como o sistema de saúde funciona, a doação de gâmetas é muitas vezes vista como uma forma de aceder aos cuidados de saúde, ao contrário do que se verifica nos países nórdicos. Ainda assim, na Dinamarca, a principal motivação para doar gâmetas masculinos prende-se com a remuneração (entre 40 a 80€ por amostra)<sup>79</sup>. Por outro lado, num estudo realizado por Thijssen *et al.*, onde avaliaram a motivação dos dadores de gâmetas belgas, verificou-se que as principais motivações se relacionavam com ajudar outras pessoas a realizar o sonho de ter uma criança ou porque simpatizavam com alguém que tinha dificuldades em engravidar<sup>80</sup>. Ainda no que diz respeito ao viés de seleção, verificou-se que, no estudo realizado no BPG, mais de metade dos indivíduos eram ainda estudantes, e com idade inferior a 30 anos. Isto implica que o estudo acabou por ser direccionado para uma faixa etária muito específica e que, na maioria dos casos, ainda não estará a pensar em ter filhos. Apesar de não permitir generalizar os resultados para a população masculina portuguesa, é relevante enfatizar que as alterações verificadas no estudo terão repercussões não só no presente, mas também no futuro, pelo que importa antecipar e prevenir os efeitos na saúde reprodutiva destes jovens. Por outro lado, poderão existir outras variáveis, não analisadas no presente estudo, que possam estar a condicionar os resultados obtidos. Um exemplo pragmático é o da avaliação do volume de ejaculado. Este parâmetro resulta essencialmente da actividade das vesículas seminais. Desta forma, dois terços do volume de ejaculado resulta de secreções produzidas pelas vesículas seminais, enquanto que quase um terço resulta de secreções prostáticas e cerca de 10% deriva do testículo e epidídimo. Para além da própria variabilidade inter-individual, vários factores poderão estar associados a alteração do volume de ejaculado, nomeadamente um período de abstinência curto (nos primeiros 4 dias de abstinência há um aumento diário de 11,9% do volume ejaculado), uma colheita incompleta, ejaculação retrógrada, entre outros<sup>81</sup>. Por último, e conforme discutido anteriormente, o número de dias de abstinência pode ser um factor confundidor, uma vez que períodos mais prolongados de abstinência estão associados a

maior volume de ejaculado, maior concentração de espermatozoides e ao mesmo tempo a uma diminuição da sua motilidade<sup>61</sup>.

Este trabalho foi o primeiro a ser realizado em Portugal com o objectivo de investigar a saúde reprodutiva masculina em candidatos saudáveis a dadores de gâmetas. Trata-se de uma primeira abordagem ao tema, tendo permitido identificar alguns pontos de interesse, tais como a necessidade de homogeneização do registo da base de dados do BPG, nomeadamente a melhor caracterização dos factores de risco dos candidatos.

# Apêndices

# Apêndice 1 – Avaliação ANOVA dos efeitos dos factores sociodemográficos e dos factores de risco nos parâmetros do espermograma

## Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: Espermograma 1 - Motilidade Progressiva (%)

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	5879,783 <sup>a</sup>	20	293,989	1,169	,284
Intercept	116735,675	1	116735,675	464,166	,000
idade25	85,876	1	85,876	,341	,560
IMC2	,735	1	,735	,003	,957
tabaco2	29,233	1	29,233	,116	,734
alcool	4,566	1	4,566	,018	,893
drogas2	42,271	1	42,271	,168	,682
idade25 * IMC2	101,880	1	101,880	,405	,525
idade25 * tabaco2	73,590	1	73,590	,293	,589
idade25 * alcool	82,663	1	82,663	,329	,567
idade25 * drogas2	544,887	1	544,887	2,167	,143
IMC2 * tabaco2	4,876	1	4,876	,019	,889
IMC2 * alcool	304,332	1	304,332	1,210	,273
IMC2 * drogas2	313,684	1	313,684	1,247	,265
tabaco2 * alcool	49,754	1	49,754	,198	,657
tabaco2 * drogas2	27,384	1	27,384	,109	,742
alcool * drogas2	,000	0	.	.	.
idade25 * IMC2 * tabaco2	427,275	1	427,275	1,699	,194
idade25 * IMC2 * alcool	446,010	1	446,010	1,773	,184
idade25 * IMC2 * drogas2	37,977	1	37,977	,151	,698
idade25 * tabaco2 * alcool	90,885	1	90,885	,361	,548
idade25 * tabaco2 * drogas2	36,345	1	36,345	,145	,704
idade25 * alcool * drogas2	,000	0	.	.	.
IMC2 * tabaco2 * alcool	12,375	1	12,375	,049	,825
IMC2 * tabaco2 * drogas2	,000	0	.	.	.
IMC2 * alcool * drogas2	,000	0	.	.	.
tabaco2 * alcool * drogas2	,000	0	.	.	.
idade25 * IMC2 * tabaco2 * alcool	,000	0	.	.	.
idade25 * IMC2 * tabaco2 * drogas2	,000	0	.	.	.
idade25 * IMC2 * alcool * drogas2	,000	0	.	.	.
idade25 * tabaco2 * alcool * drogas2	,000	0	.	.	.
IMC2 * tabaco2 * alcool * drogas2	,000	0	.	.	.
idade25 * IMC2 * tabaco2 * alcool * drogas2	,000	0	.	.	.
Error	51556,627	205	251,496		
Total	718927,930	226			
Corrected Total	57436,410	225			

a. R Squared = ,102 (Adjusted R Squared = ,015)

### Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: Espermograma 1 - Concentração (\*10<sup>6</sup>/ml)

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	52776,504 <sup>a</sup>	20	2638,825	,617	,898
Intercept	240117,510	1	240117,510	56,141	,000
idade25	13,077	1	13,077	,003	,956
IMC2	50,976	1	50,976	,012	,913
tabaco2	3709,117	1	3709,117	,867	,353
alcool	2044,457	1	2044,457	,478	,490
drogas2	448,745	1	448,745	,105	,746
idade25 * IMC2	4048,632	1	4048,632	,947	,332
idade25 * tabaco2	5676,097	1	5676,097	1,327	,251
idade25 * alcool	6497,520	1	6497,520	1,519	,219
idade25 * drogas2	609,166	1	609,166	,142	,706
IMC2 * tabaco2	3180,019	1	3180,019	,744	,390
IMC2 * alcool	2208,655	1	2208,655	,516	,473
IMC2 * drogas2	3422,840	1	3422,840	,800	,372
tabaco2 * alcool	1813,800	1	1813,800	,424	,516
tabaco2 * drogas2	1667,847	1	1667,847	,390	,533
alcool * drogas2	,000	0	.	.	.
idade25 * IMC2 * tabaco2	4,190	1	4,190	,001	,975
idade25 * IMC2 * alcool	1805,920	1	1805,920	,422	,517
idade25 * IMC2 * drogas2	58,947	1	58,947	,014	,907
idade25 * tabaco2 * alcool	1925,010	1	1925,010	,450	,503
idade25 * tabaco2 * drogas2	2251,105	1	2251,105	,526	,469
idade25 * alcool * drogas2	,000	0	.	.	.
IMC2 * tabaco2 * alcool	1359,859	1	1359,859	,318	,573
IMC2 * tabaco2 * drogas2	,000	0	.	.	.
IMC2 * alcool * drogas2	,000	0	.	.	.
tabaco2 * alcool * drogas2	,000	0	.	.	.
idade25 * IMC2 * tabaco2 * alcool	,000	0	.	.	.
idade25 * IMC2 * tabaco2 * drogas2	,000	0	.	.	.
idade25 * IMC2 * alcool * drogas2	,000	0	.	.	.
idade25 * tabaco2 * alcool * drogas2	,000	0	.	.	.
IMC2 * tabaco2 * alcool * drogas2	,000	0	.	.	.
idade25 * IMC2 * tabaco2 * alcool * drogas2	,000	0	.	.	.
Error	876787,226	205	4277,011		
Total	2430761,130	226			
Corrected Total	929563,730	225			

a. R Squared = ,057 (Adjusted R Squared = -,035)

### Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: Espermograma 1 - Morfologia Normal (%)

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	619,646 <sup>a</sup>	20	30,982	2,615	,000
Intercept	2959,052	1	2959,052	249,785	,000
idade25	,021	1	,021	,002	,967
IMC2	132,164	1	132,164	11,156	,001
tabaco2	76,688	1	76,688	6,474	,012
alcool	46,477	1	46,477	3,923	,049
drogas2	1,017	1	1,017	,086	,770
idade25 * IMC2	12,303	1	12,303	1,039	,309
idade25 * tabaco2	18,158	1	18,158	1,533	,217
idade25 * alcool	8,233	1	8,233	,695	,405
idade25 * drogas2	20,528	1	20,528	1,733	,190
IMC2 * tabaco2	202,362	1	202,362	17,082	,000
IMC2 * alcool	110,107	1	110,107	9,295	,003
IMC2 * drogas2	19,768	1	19,768	1,669	,198
tabaco2 * alcool	142,666	1	142,666	12,043	,001
tabaco2 * drogas2	5,782	1	5,782	,488	,486
alcool * drogas2	,000	0	.	.	.
idade25 * IMC2 * tabaco2	7,610	1	7,610	,642	,424
idade25 * IMC2 * alcool	9,248	1	9,248	,781	,378
idade25 * IMC2 * drogas2	6,222	1	6,222	,525	,469
idade25 * tabaco2 * alcool	44,036	1	44,036	3,717	,055
idade25 * tabaco2 * drogas2	9,339	1	9,339	,788	,376
idade25 * alcool * drogas2	,000	0	.	.	.
IMC2 * tabaco2 * alcool	116,610	1	116,610	9,843	,002
IMC2 * tabaco2 * drogas2	,000	0	.	.	.
IMC2 * alcool * drogas2	,000	0	.	.	.
tabaco2 * alcool * drogas2	,000	0	.	.	.
idade25 * IMC2 * tabaco2 * alcool	,000	0	.	.	.
idade25 * IMC2 * tabaco2 * drogas2	,000	0	.	.	.
idade25 * IMC2 * alcool * drogas2	,000	0	.	.	.
idade25 * tabaco2 * alcool * drogas2	,000	0	.	.	.
IMC2 * tabaco2 * alcool * drogas2	,000	0	.	.	.
idade25 * IMC2 * tabaco2 * alcool * drogas2	,000	0	.	.	.
Error	2416,669	204	11,846		
Total	15476,000	225			
Corrected Total	3036,316	224			

a. R Squared = ,204 (Adjusted R Squared = ,126)

### Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: Espermograma 1 - Leucócitos

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	41,252 <sup>a</sup>	20	2,063	,330	,997
Intercept	5,759	1	5,759	,920	,339
idade25	,343	1	,343	,055	,815
IMC2	,001	1	,001	,000	,988
tabaco2	,637	1	,637	,102	,750
alcool	1,999	1	1,999	,319	,573
drogas2	,243	1	,243	,039	,844
idade25 * IMC2	,087	1	,087	,014	,906
idade25 * tabaco2	,085	1	,085	,014	,907
idade25 * alcool	,789	1	,789	,126	,723
idade25 * drogas2	,044	1	,044	,007	,933
IMC2 * tabaco2	,303	1	,303	,048	,826
IMC2 * alcool	,044	1	,044	,007	,933
IMC2 * drogas2	,289	1	,289	,046	,830
tabaco2 * alcool	,008	1	,008	,001	,972
tabaco2 * drogas2	,251	1	,251	,040	,842
alcool * drogas2	,000	0	.	.	.
idade25 * IMC2 * tabaco2	,096	1	,096	,015	,902
idade25 * IMC2 * alcool	3,484E-5	1	3,484E-5	,000	,998
idade25 * IMC2 * drogas2	,289	1	,289	,046	,830
idade25 * tabaco2 * alcool	1,234	1	1,234	,197	,658
idade25 * tabaco2 * drogas2	2,485	1	2,485	,397	,529
idade25 * alcool * drogas2	,000	0	.	.	.
IMC2 * tabaco2 * alcool	1,191	1	1,191	,190	,663
IMC2 * tabaco2 * drogas2	,000	0	.	.	.
IMC2 * alcool * drogas2	,000	0	.	.	.
tabaco2 * alcool * drogas2	,000	0	.	.	.
idade25 * IMC2 * tabaco2 * alcool	,000	0	.	.	.
idade25 * IMC2 * tabaco2 * drogas2	,000	0	.	.	.
idade25 * IMC2 * alcool * drogas2	,000	0	.	.	.
idade25 * tabaco2 * alcool * drogas2	,000	0	.	.	.
IMC2 * tabaco2 * alcool * drogas2	,000	0	.	.	.
idade25 * IMC2 * tabaco2 * alcool * drogas2	,000	0	.	.	.
Error	1282,964	205	6,258		
Total	1373,000	226			
Corrected Total	1324,217	225			

a. R Squared = ,031 (Adjusted R Squared = -,063)



### Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: Espermograma 1 - Volume

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	66,964 <sup>a</sup>	20	3,348	1,381	,134
Intercept	314,491	1	314,491	129,719	,000
idade25	4,545	1	4,545	1,875	,172
IMC2	12,451	1	12,451	5,136	,024
tabaco2	,006	1	,006	,002	,960
alcool	3,588	1	3,588	1,480	,225
drogas2	,009	1	,009	,004	,950
idade25 * IMC2	,106	1	,106	,044	,834
idade25 * tabaco2	16,116	1	16,116	6,647	,011
idade25 * alcool	1,440	1	1,440	,594	,442
idade25 * drogas2	,572	1	,572	,236	,628
IMC2 * tabaco2	16,029	1	16,029	6,612	,011
IMC2 * alcool	2,940	1	2,940	1,212	,272
IMC2 * drogas2	,007	1	,007	,003	,957
tabaco2 * alcool	2,638	1	2,638	1,088	,298
tabaco2 * drogas2	8,053	1	8,053	3,322	,070
alcool * drogas2	,000	0	.	.	.
idade25 * IMC2 * tabaco2	1,535	1	1,535	,633	,427
idade25 * IMC2 * alcool	7,666	1	7,666	3,162	,077
idade25 * IMC2 * drogas2	,307	1	,307	,127	,722
idade25 * tabaco2 * alcool	5,211	1	5,211	2,149	,144
idade25 * tabaco2 * drogas2	9,652	1	9,652	3,981	,047
idade25 * alcool * drogas2	,000	0	.	.	.
IMC2 * tabaco2 * alcool	1,643	1	1,643	,678	,411
IMC2 * tabaco2 * drogas2	,000	0	.	.	.
IMC2 * alcool * drogas2	,000	0	.	.	.
tabaco2 * alcool * drogas2	,000	0	.	.	.
idade25 * IMC2 * tabaco2 * alcool	,000	0	.	.	.
idade25 * IMC2 * tabaco2 * drogas2	,000	0	.	.	.
idade25 * IMC2 * alcool * drogas2	,000	0	.	.	.
idade25 * tabaco2 * alcool * drogas2	,000	0	.	.	.
IMC2 * tabaco2 * alcool * drogas2	,000	0	.	.	.
idade25 * IMC2 * tabaco2 * alcool * drogas2	,000	0	.	.	.
Error	497,004	205	2,424		
Total	2788,220	226			
Corrected Total	563,968	225			

a. R Squared = ,119 (Adjusted R Squared = ,033)

### Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: Espermograma 1 - Morfologia Normal (%)

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	619,646 <sup>a</sup>	20	30,982	2,615	,000
Intercept	2959,052	1	2959,052	249,785	,000
idade25	,021	1	,021	,002	,967
IMC2	132,164	1	132,164	11,156	,001
tabaco2	76,688	1	76,688	6,474	,012
alcool	46,477	1	46,477	3,923	,049
drogas2	1,017	1	1,017	,086	,770
idade25 * IMC2	12,303	1	12,303	1,039	,309
idade25 * tabaco2	18,158	1	18,158	1,533	,217
idade25 * alcool	8,233	1	8,233	,695	,405
idade25 * drogas2	20,528	1	20,528	1,733	,190
IMC2 * tabaco2	202,362	1	202,362	17,082	,000
IMC2 * alcool	110,107	1	110,107	9,295	,003
IMC2 * drogas2	19,768	1	19,768	1,669	,198
tabaco2 * alcool	142,666	1	142,666	12,043	,001
tabaco2 * drogas2	5,782	1	5,782	,488	,486
alcool * drogas2	,000	0	.	.	.
idade25 * IMC2 * tabaco2	7,610	1	7,610	,642	,424
idade25 * IMC2 * alcool	9,248	1	9,248	,781	,378
idade25 * IMC2 * drogas2	6,222	1	6,222	,525	,469
idade25 * tabaco2 * alcool	44,036	1	44,036	3,717	,055
idade25 * tabaco2 * drogas2	9,339	1	9,339	,788	,376
idade25 * alcool * drogas2	,000	0	.	.	.
IMC2 * tabaco2 * alcool	116,610	1	116,610	9,843	,002
IMC2 * tabaco2 * drogas2	,000	0	.	.	.
IMC2 * alcool * drogas2	,000	0	.	.	.
tabaco2 * alcool * drogas2	,000	0	.	.	.
idade25 * IMC2 * tabaco2 * alcool	,000	0	.	.	.
idade25 * IMC2 * tabaco2 * drogas2	,000	0	.	.	.
idade25 * IMC2 * alcool * drogas2	,000	0	.	.	.
idade25 * tabaco2 * alcool * drogas2	,000	0	.	.	.
IMC2 * tabaco2 * alcool * drogas2	,000	0	.	.	.
idade25 * IMC2 * tabaco2 * alcool * drogas2	,000	0	.	.	.
Error	2416,669	204	11,846		
Total	15476,000	225			
Corrected Total	3036,316	224			

a. R Squared = ,204 (Adjusted R Squared = ,126)

## Apêndice 2 – Avaliação ANOVA dos indivíduos com espermogramas anormais

### Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: Espermograma 1 - Volume

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	58,403 <sup>a</sup>	17	3,435	1,581	,100
Intercept	197,995	1	197,995	91,124	,000
idade25	1,253	1	1,253	,577	,451
IMC2	3,026	1	3,026	1,393	,243
tabaco2	3,290	1	3,290	1,514	,224
alcool	,050	1	,050	,023	,880
drogas2	,856	1	,856	,394	,533
idade25 * IMC2	,820	1	,820	,378	,541
idade25 * tabaco2	,026	1	,026	,012	,914
idade25 * alcool	7,390	1	7,390	3,401	,070
idade25 * drogas2	,536	1	,536	,246	,621
IMC2 * tabaco2	1,683	1	1,683	,774	,382
IMC2 * alcool	1,460	1	1,460	,672	,416
IMC2 * drogas2	,000	0	.	.	.
tabaco2 * alcool	1,313	1	1,313	,604	,440
tabaco2 * drogas2	9,995	1	9,995	4,600	,036
alcool * drogas2	,000	0	.	.	.
idade25 * IMC2 * tabaco2	,003	1	,003	,001	,972
idade25 * IMC2 * alcool	1,687	1	1,687	,777	,382
idade25 * IMC2 * drogas2	,000	0	.	.	.
idade25 * tabaco2 * alcool	,000	0	.	.	.
idade25 * tabaco2 * drogas2	15,324	1	15,324	7,053	,010
idade25 * alcool * drogas2	,000	0	.	.	.
IMC2 * tabaco2 * alcool	,001	1	,001	,000	,983
IMC2 * tabaco2 * drogas2	,000	0	.	.	.
IMC2 * alcool * drogas2	,000	0	.	.	.
tabaco2 * alcool * drogas2	,000	0	.	.	.
idade25 * IMC2 * tabaco2 * alcool	,000	0	.	.	.
idade25 * IMC2 * tabaco2 * drogas2	,000	0	.	.	.
idade25 * IMC2 * alcool * drogas2	,000	0	.	.	.
idade25 * tabaco2 * alcool * drogas2	,000	0	.	.	.
IMC2 * tabaco2 * alcool * drogas2	,000	0	.	.	.
idade25 * IMC2 * tabaco2 * alcool * drogas2	,000	0	.	.	.
Error	126,023	58	2,173		
Total	681,170	76			
Corrected Total	184,427	75			

a. R Squared = ,317 (Adjusted R Squared = ,116)

### Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: Espermograma 1 - pH

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	1,795 <sup>a</sup>	17	,106	,847	,634
Intercept	2000,217	1	2000,217	16055,494	,000
idade25	,422	1	,422	3,386	,071
IMC2	,234	1	,234	1,881	,176
tabaco2	,122	1	,122	,981	,326
alcool	,019	1	,019	,153	,697
drogas2	,315	1	,315	2,525	,118
idade25 * IMC2	,116	1	,116	,932	,339
idade25 * tabaco2	,001	1	,001	,011	,918
idade25 * alcool	,056	1	,056	,453	,504
idade25 * drogas2	,107	1	,107	,859	,358
IMC2 * tabaco2	,160	1	,160	1,280	,263
IMC2 * alcool	,208	1	,208	1,670	,202
IMC2 * drogas2	,000	0	.	.	.
tabaco2 * alcool	,031	1	,031	,248	,621
tabaco2 * drogas2	,155	1	,155	1,241	,270
alcool * drogas2	,000	0	.	.	.
idade25 * IMC2 * tabaco2	,235	1	,235	1,884	,176
idade25 * IMC2 * alcool	,132	1	,132	1,059	,308
idade25 * IMC2 * drogas2	,000	0	.	.	.
idade25 * tabaco2 * alcool	,000	0	.	.	.
idade25 * tabaco2 * drogas2	,025	1	,025	,204	,653
idade25 * alcool * drogas2	,000	0	.	.	.
IMC2 * tabaco2 * alcool	,127	1	,127	1,020	,317
IMC2 * tabaco2 * drogas2	,000	0	.	.	.
IMC2 * alcool * drogas2	,000	0	.	.	.
tabaco2 * alcool * drogas2	,000	0	.	.	.
idade25 * IMC2 * tabaco2 * alcool	,000	0	.	.	.
idade25 * IMC2 * tabaco2 * drogas2	,000	0	.	.	.
idade25 * IMC2 * alcool * drogas2	,000	0	.	.	.
idade25 * tabaco2 * alcool * drogas2	,000	0	.	.	.
IMC2 * tabaco2 * alcool * drogas2	,000	0	.	.	.
idade25 * IMC2 * tabaco2 * alcool * drogas2	,000	0	.	.	.
Error	6,852	55	,125		
Total	4777,140	73			
Corrected Total	8,647	72			

a. R Squared = ,208 (Adjusted R Squared = -,037)

### Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: Espermograma 1 - Motilidade Progressiva (%)

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	7005,241 <sup>a</sup>	17	412,073	1,165	,321
Intercept	59689,444	1	59689,444	168,704	,000
idade25	169,353	1	169,353	,479	,492
IMC2	27,855	1	27,855	,079	,780
tabaco2	102,723	1	102,723	,290	,592
alcool	92,818	1	92,818	,262	,610
drogas2	143,740	1	143,740	,406	,526
idade25 * IMC2	325,480	1	325,480	,920	,341
idade25 * tabaco2	54,203	1	54,203	,153	,697
idade25 * alcool	611,300	1	611,300	1,728	,194
idade25 * drogas2	27,435	1	27,435	,078	,782
IMC2 * tabaco2	70,848	1	70,848	,200	,656
IMC2 * alcool	1363,323	1	1363,323	3,853	,054
IMC2 * drogas2	,000	0	.	.	.
tabaco2 * alcool	117,060	1	117,060	,331	,567
tabaco2 * drogas2	63,939	1	63,939	,181	,672
alcool * drogas2	,000	0	.	.	.
idade25 * IMC2 * tabaco2	543,370	1	543,370	1,536	,220
idade25 * IMC2 * alcool	1358,455	1	1358,455	3,839	,055
idade25 * IMC2 * drogas2	,000	0	.	.	.
idade25 * tabaco2 * alcool	,000	0	.	.	.
idade25 * tabaco2 * drogas2	193,625	1	193,625	,547	,462
idade25 * alcool * drogas2	,000	0	.	.	.
IMC2 * tabaco2 * alcool	39,765	1	39,765	,112	,739
IMC2 * tabaco2 * drogas2	,000	0	.	.	.
IMC2 * alcool * drogas2	,000	0	.	.	.
tabaco2 * alcool * drogas2	,000	0	.	.	.
idade25 * IMC2 * tabaco2 * alcool	,000	0	.	.	.
idade25 * IMC2 * tabaco2 * drogas2	,000	0	.	.	.
idade25 * IMC2 * alcool * drogas2	,000	0	.	.	.
idade25 * tabaco2 * alcool * drogas2	,000	0	.	.	.
IMC2 * tabaco2 * alcool * drogas2	,000	0	.	.	.
idade25 * IMC2 * tabaco2 * alcool * drogas2	,000	0	.	.	.
Error	20521,118	58	353,812		
Total	172916,370	76			
Corrected Total	27526,359	75			

a. R Squared = ,254 (Adjusted R Squared = ,036)

### Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: Espermograma 1 - Concentração (\*10<sup>6</sup>/ml)

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	43440,339 <sup>a</sup>	17	2555,314	,689	,800
Intercept	71965,287	1	71965,287	19,410	,000
idade25	24,515	1	24,515	,007	,935
IMC2	5348,363	1	5348,363	1,443	,235
tabaco2	322,124	1	322,124	,087	,769
alcool	527,169	1	527,169	,142	,707
drogas2	3308,228	1	3308,228	,892	,349
idade25 * IMC2	9214,046	1	9214,046	2,485	,120
idade25 * tabaco2	3,588	1	3,588	,001	,975
idade25 * alcool	12060,117	1	12060,117	3,253	,076
idade25 * drogas2	1142,679	1	1142,679	,308	,581
IMC2 * tabaco2	895,463	1	895,463	,242	,625
IMC2 * alcool	952,521	1	952,521	,257	,614
IMC2 * drogas2	,000	0	.	.	.
tabaco2 * alcool	781,489	1	781,489	,211	,648
tabaco2 * drogas2	134,851	1	134,851	,036	,849
alcool * drogas2	,000	0	.	.	.
idade25 * IMC2 * tabaco2	1990,741	1	1990,741	,537	,467
idade25 * IMC2 * alcool	7198,366	1	7198,366	1,941	,169
idade25 * IMC2 * drogas2	,000	0	.	.	.
idade25 * tabaco2 * alcool	,000	0	.	.	.
idade25 * tabaco2 * drogas2	461,719	1	461,719	,125	,725
idade25 * alcool * drogas2	,000	0	.	.	.
IMC2 * tabaco2 * alcool	1551,242	1	1551,242	,418	,520
IMC2 * tabaco2 * drogas2	,000	0	.	.	.
IMC2 * alcool * drogas2	,000	0	.	.	.
tabaco2 * alcool * drogas2	,000	0	.	.	.
idade25 * IMC2 * tabaco2 * alcool	,000	0	.	.	.
idade25 * IMC2 * tabaco2 * drogas2	,000	0	.	.	.
idade25 * IMC2 * alcool * drogas2	,000	0	.	.	.
idade25 * tabaco2 * alcool * drogas2	,000	0	.	.	.
IMC2 * tabaco2 * alcool * drogas2	,000	0	.	.	.
idade25 * IMC2 * tabaco2 * alcool * drogas2	,000	0	.	.	.
Error	215042,638	58	3707,632		
Total	537000,880	76			
Corrected Total	258482,977	75			

a. R Squared = ,168 (Adjusted R Squared = -,076)

### Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: Espermograma 1 - Leucócitos

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	208,702 <sup>a</sup>	17	12,277	,691	,799
Intercept	35,424	1	35,424	1,993	,163
idade25	13,061	1	13,061	,735	,395
IMC2	,136	1	,136	,008	,931
tabaco2	32,000	1	32,000	1,800	,185
alcool	3,896	1	3,896	,219	,641
drogas2	2,889	1	2,889	,163	,688
idade25 * IMC2	,122	1	,122	,007	,934
idade25 * tabaco2	,507	1	,507	,029	,866
idade25 * alcool	25,358	1	25,358	1,427	,237
idade25 * drogas2	1,567	1	1,567	,088	,768
IMC2 * tabaco2	1,331	1	1,331	,075	,785
IMC2 * alcool	1,873	1	1,873	,105	,747
IMC2 * drogas2	,000	0	.	.	.
tabaco2 * alcool	6,067	1	6,067	,341	,561
tabaco2 * drogas2	,337	1	,337	,019	,891
alcool * drogas2	,000	0	.	.	.
idade25 * IMC2 * tabaco2	1,452	1	1,452	,082	,776
idade25 * IMC2 * alcool	11,231	1	11,231	,632	,430
idade25 * IMC2 * drogas2	,000	0	.	.	.
idade25 * tabaco2 * alcool	,000	0	.	.	.
idade25 * tabaco2 * drogas2	5,624	1	5,624	,316	,576
idade25 * alcool * drogas2	,000	0	.	.	.
IMC2 * tabaco2 * alcool	9,659	1	9,659	,543	,464
IMC2 * tabaco2 * drogas2	,000	0	.	.	.
IMC2 * alcool * drogas2	,000	0	.	.	.
tabaco2 * alcool * drogas2	,000	0	.	.	.
idade25 * IMC2 * tabaco2 * alcool	,000	0	.	.	.
idade25 * IMC2 * tabaco2 * drogas2	,000	0	.	.	.
idade25 * IMC2 * alcool * drogas2	,000	0	.	.	.
idade25 * tabaco2 * alcool * drogas2	,000	0	.	.	.
IMC2 * tabaco2 * alcool * drogas2	,000	0	.	.	.
idade25 * IMC2 * tabaco2 * alcool * drogas2	,000	0	.	.	.
Error	1030,930	58	17,775		
Total	1366,000	76			
Corrected Total	1239,632	75			

a. R Squared = ,168 (Adjusted R Squared = -,075)

# Bibliografia

1. DGS. Programa Nacional Saúde Reprodutiva. Available at: <http://www.saudereprodutiva.dgs.pt/>. (Accessed: 30th July 2018)
2. Sexual and Reproductive Health in Primary Care. Where Do We Go from Here ? in *The World Book of Family Medicine* (2016).
3. Fathalla, M. F. & Fathalla, M. M. F. Sexual and Reproductive Health: Overview. in *International Encyclopedia of Public Health (Second Edition)* (ed. Quah, S. R.) 481–490 (Academic Press, 2017). doi:10.1016/B978-0-12-803678-5.00402-1
4. WHO | Infertility definitions and terminology. Available at: <http://www.who.int/reproductivehealth/topics/infertility/definitions/en/>. (Accessed: 23rd August 2018)
5. Vander Borgh, M. & Wyns, C. Fertility and infertility: Definition and epidemiology. *Clin. Biochem.* (2018). doi:10.1016/j.clinbiochem.2018.03.012
6. *Lei nº17/2016 - Diário da República nº116/2016, Série I de 2016/06/20.*
7. Lindsay, T. J. & Vitrikas, K. Evaluation and Treatment of Infertility. *Am. Fam. Physician* **91**, 308–314 (2015).
8. Roldan, E. R. S. Male Fertility Overview. in *Encyclopedia of Reproduction (Second Edition)* (ed. Skinner, M. K.) 408–415 (Academic Press, 2018). doi:10.1016/B978-0-12-801238-3.64608-1
9. Lindgren, M. C. Male Infertility. *Physician Assist. Clin.* **3**, 139–147 (2018).
10. Mascarenhas, M. N., Flaxman, S. R., Boerma, T., Vanderpoel, S. & Stevens, G. A. National, Regional, and Global Trends in Infertility Prevalence Since 1990: A Systematic Analysis of 277 Health Surveys. *PLOS Med.* **9**, e1001356 (2012).
11. Agarwal, A., Mulgund, A., Hamada, A. & Chyatte, M. R. A unique view on male infertility around the globe. *Reprod. Biol. Endocrinol.* **13**, 37 (2015).
12. Ing, N. H., Curley, K. O., Welsh, T. H., Johnson, L. & Staub, C. 4.02 - Anatomy and Physiology of the Male Reproductive System and Potential Targets of Toxicants☆. in *Comprehensive Toxicology (Third Edition)* (ed. McQueen, C. A.) 2–63 (Elsevier, 2018). doi:10.1016/B978-0-12-801238-3.02134-6
13. Nishimura, H. & L'Hernault, S. W. Spermatogenesis. *Curr. Biol.* **27**, R988–R994 (2017).
14. Nieschlag, E., Behre, H. M. & Nieschlag, S. *Andrology: Male Reproductive Health and Dysfunction*. (Springer-Verlag, 2010).
15. Schjenken, J. E., Sharkey, D. J. & Robertson, S. A. Seminal Vesicle—Secretion. in *Encyclopedia of Reproduction (Second Edition)* (ed. Skinner, M. K.) 349–354 (Academic Press, 2018). doi:10.1016/B978-0-12-801238-3.64600-7



16. Costello, L. C. & Franklin, R. B. A comprehensive review of the role of zinc in normal prostate function and metabolism; and its implications in prostate cancer. *Arch. Biochem. Biophys.* **611**, 100–112 (2016).
17. Carlson, B. M. *Human Embryology and Developmental Biology E-Book: with STUDENT CONSULT Online Access.* (Elsevier Health Sciences, 2012).
18. Schoenwolf, G. C., Bleyl, S. B., Brauer, P. R. & Francis-West, P. H. *Larsen's Human Embryology E-Book.* (Elsevier Health Sciences, 2014).
19. Fode, M., Fusco, F., Lipshultz, L. & Weidner, W. Sexually Transmitted Disease and Male Infertility: A Systematic Review. *Eur. Urol. Focus* **2**, 383–393 (2016).
20. Ochsendorf, F. R. Sexually transmitted infections: impact on male fertility. *Andrologia* **40**, 72–75 (2008).
21. Durairajanayagam, D. Lifestyle causes of male infertility. *Arab J. Urol.* **16**, 10–20 (2018).
22. La Nasa, J. A. Chapter 7 - Obesity, Hypogonadism, and Male Fertility—The Role of Diet and Environment. in *Bioenvironmental Issues Affecting Men's Reproductive and Sexual Health* (eds. Sikka, S. C. & Hellstrom, W. J. G.) 107–119 (Academic Press, 2018). doi:10.1016/B978-0-12-801299-4.00007-4
23. Sobinoff, A. P. *et al.* Damaging legacy: maternal cigarette smoking has long-term consequences for male offspring fertility. *Hum. Reprod.* **29**, 2719–2735 (2014).
24. Camlin, N. J. *et al.* Maternal Smoke Exposure Impairs the Long-Term Fertility of Female Offspring in a Murine Model. *Biol. Reprod.* **94**, (2016).
25. Salas-Huetos, A., Bulló, M. & Salas-Salvadó, J. Dietary patterns, foods and nutrients in male fertility parameters and fecundability: a systematic review of observational studies. *Hum. Reprod. Update* **23**, 371–389 (2017).
26. Ricci, E. *et al.* Semen quality and alcohol intake: a systematic review and meta-analysis. *Reprod. Biomed. Online* **34**, 38–47 (2017).
27. Rosety, M. Á. *et al.* Exercise improved semen quality and reproductive hormone levels in sedentary obese adults. *Nutr. Hosp.* **34**, 603–607 (2017).
28. Wise, L. A., Cramer, D. W., Hornstein, M. D., Ashby, R. K. & Missmer, S. A. Physical activity and semen quality among men attending an infertility clinic. *Fertil. Steril.* **95**, 1025–1030 (2011).
29. Kipandula, W. & Lampiao, F. Semen profiles of young men involved as bicycle taxi cyclists in Mangochi District, Malawi: A case-control study. *Malawi Med. J.* **27**, 151–153 (2015).
30. Józków, P. & Rossato, M. The Impact of Intense Exercise on Semen Quality. *Am. J. Mens Health* **11**, 654–662 (2017).
31. Hwang, K. & Guo, D. Sports-related Male Infertility. *Eur. Urol. Focus* article in press (2018). doi:10.1016/j.euf.2018.04.010

32. Brant, W. O., Myers, J. B., Carrell, D. T. & Smith, J. F. Male athletic activities and their effects on semen and hormonal parameters. *Phys. Sportsmed.* **38**, 114–120 (2010).
33. Bhongade, M. B. *et al.* Effect of psychological stress on fertility hormones and seminal quality in male partners of infertile couples. *Andrologia* **47**, 336–342 (2015).
34. Ma, Y. *et al.* Effects of environmental contaminants on fertility and reproductive health. *J. Environ. Sci.* (2018). doi:10.1016/j.jes.2018.07.015
35. Palnitkar, G. *et al.* Linking Sleep Disturbance To Idiopathic Male Infertility. *Sleep Med. Rev.* (2018). doi:10.1016/j.smr.2018.07.006
36. Park, N. C. Sperm Bank: From Laboratory to Patient. *World J. Mens Health* **36**, 89–91 (2018).
37. Barratt, C., Englert, Y., Gottlieb, C. & Jouannet, P. Gamete donation guidelines. The Corsendonk consensus document for the European Union. *Hum. Reprod.* **13**, 500–501 (1998).
38. *Despacho n.º 3219/2011 de 17 de Fevereiro - Diário da República - 2.ª Série, n.º 34, Pág. 8375.*
39. *Despacho n.º 679/2017 de 11 de Janeiro- Diário da República n.º 8/2017, Série II de 2017-01-11, páginas 1098 - 1099. Diário da República Eletrónico Available at: <https://dre.pt/home/-/dre/105745517/details/5/maximized?serie=II&dreId=105738722>. (Accessed: 28th May 2019)*
40. Banco Público de Gâmetas. Available at: <https://www.sns.gov.pt/cidadao/banco-publico-de-gametas-2/>. (Accessed: 13th October 2018)
41. *Lei n.º32/2006 - Diário da República n.º143/2006, Série I de 2006/07/26.*
42. *Acórdão do Tribunal Constitucional 225/2018, - Diário da República n.º 87/2018, Série I de 2018-05-07. Diário da República Eletrónico Available at: <https://dre.pt/home/-/dre/115226940/details/maximized>. (Accessed: 4th June 2019)*
43. Banco Público de Gâmetas. IT.CPMA.BG.021/5 - Avaliação e seleção de candidatos a dadores - 1ª consulta.
44. Banco Público de Gâmetas. IT.CPMA.BG.067/3 - Entrevista a dadores.
45. Banco Público de Gâmetas. IT.CPMA.BG.055/3 - Critérios de exclusão de candidato a dador de esperma.
46. Banco Público de Gâmetas. IT.CPMA.BG.033/6 - Critérios de aceitação ou rejeição para dádivas, Critérios de rejeição de dadores.
47. Banco Público de Gâmetas. IT.CPMA.BG.021/4 - Candidato a dador masculino - Estudo e processo de doação.
48. Merzenich, H., Zeeb, H. & Blettner, M. Decreasing sperm quality: a global problem? *BMC Public Health* **10**, 24 (2010).

49. Deonandan, R. & Jaleel, M. Global decline in semen quality: ignoring the developing world introduces selection bias. *Int. J. Gen. Med.* **5**, 303–306 (2012).
50. Portal do INE. Available at: [https://www.ine.pt/xportal/xmain?xpid=INE&xpgid=ine\\_publicacoes&PUBLICACOESpub\\_bo ui=107961853&PUBLICACOESmodo=2&xlang=pt](https://www.ine.pt/xportal/xmain?xpid=INE&xpgid=ine_publicacoes&PUBLICACOESpub_bo ui=107961853&PUBLICACOESmodo=2&xlang=pt). (Accessed: 1st May 2019)
51. Ombelet, W. *et al.* In search for the general population's semen profile: the study of sperm parameters in partners of women with chronic anovulation. *Facts Views Vis. ObGyn* **1**, 18–26 (2009).
52. Szczygiel, M. & Kurpisz, M. Teratozoospermia and its effect on male fertility potential. *Andrologia* **31**, 63–75 (1999).
53. Swan, S. H., Elkin, E. P. & Fenster, L. The question of declining sperm density revisited: an analysis of 101 studies published 1934-1996. *Environ. Health Perspect.* **108**, 961–966 (2000).
54. Carlsen, E., Giwercman, A., Keiding, N. & Skakkebaek, N. E. Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years. *BMJ* **305**, 609–613 (1992).
55. Sengupta, P., Borges, E., Dutta, S. & Krajewska-Kulak, E. Decline in sperm count in European men during the past 50 years. *Hum. Exp. Toxicol.* **37**, 247–255 (2018).
56. Hoven, L. van den, Hendriks, J. C. M., Verbeet, J. G. M., Westphal, J. R. & Wetzels, A. M. M. Status of sperm morphology assessment: an evaluation of methodology and clinical value. *Fertil. Steril.* **103**, 53–58 (2015).
57. Splingart, C. *et al.* Semen variation in a population of fertile donors: evaluation in a French centre over a 34-year period. *Int. J. Androl.* **35**, 467–474 (2012).
58. Stone, B. A., Alex, A., Werlin, L. B. & Marrs, R. P. Age thresholds for changes in semen parameters in men. *Fertil. Steril.* **100**, 952–958 (2013).
59. Kidd, S. A., Eskenazi, B. & Wyrobek, A. J. Effects of male age on semen quality and fertility: a review of the literature. *Fertil. Steril.* **75**, 237–248 (2001).
60. Oliveira, J. B. A. *et al.* The effects of age on sperm quality: an evaluation of 1,500 semen samples. *JBRA Assist. Reprod.* **18**, (2014).
61. Auger, J., Kunstmann, J. M., Czyglik, F. & Jouannet, P. Decline in Semen Quality among Fertile Men in Paris during the Past 20 Years. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJM199502023320501> (2009). doi:10.1056/NEJM199502023320501
62. PORDATA. Idade média da mãe ao nascimento do primeiro filho. Available at: <https://www.pordata.pt/Portugal/Idade+m%C3%A9dia+da+m%C3%A3e+ao+nascimento+do+primeiro+filho-805>. (Accessed: 14th May 2019)
63. Belan, M. *et al.* Male partners of subfertile couples in which the spouse is obese display adverse weight and lifestyle associated with reduced sperm quality. *Obes. Res. Clin. Pract.* (2019). doi:10.1016/j.orcp.2019.03.001

64. Bieniek, J. M. *et al.* Influence of increasing body mass index on semen and reproductive hormonal parameters in a multi-institutional cohort of subfertile men. *Fertil. Steril.* **106**, 1070–1075 (2016).
65. Campbell, J. M., Lane, M., Owens, J. A. & Bakos, H. W. Paternal obesity negatively affects male fertility and assisted reproduction outcomes: a systematic review and meta-analysis. *Reprod. Biomed. Online* **31**, 593–604 (2015).
66. DGS. Programa Nacional de Combate à Obesidade. (2017). Available at: <https://www.dgs.pt/areas-em-destaque/plano-nacional-de-saude/programas-nacionais/programa-nacional-de-combate-a-obesidade.aspx>. (Accessed: 14th May 2019)
67. Samavat, J. *et al.* Massive Weight Loss Obtained by Bariatric Surgery Affects Semen Quality in Morbid Male Obesity: a Preliminary Prospective Double-Armed Study. *Obes. Surg.* **28**, 69–76 (2018).
68. Zhang, Z. H. *et al.* Decline of semen quality and increase of leukocytes with cigarette smoking in infertile men. *Iran. J. Reprod. Med.* **11**, 589–596 (2013).
69. Sharma, R., Harlev, A., Agarwal, A. & Esteves, S. C. Cigarette Smoking and Semen Quality: A New Meta-analysis Examining the Effect of the 2010 World Health Organization Laboratory Methods for the Examination of Human Semen. *Eur. Urol.* **70**, 635–645 (2016).
70. Trummer, H., Habermann, H., Haas, J. & Pummer, K. The impact of cigarette smoking on human semen parameters and hormones. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* **17**, 1554–1559 (2002).
71. Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. Electronic address: [asrm@asrm.org](mailto:asrm@asrm.org) & Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. Smoking and infertility: a committee opinion. *Fertil. Steril.* **110**, 611–618 (2018).
72. Sansone, A. *et al.* Smoke, alcohol and drug addiction and male fertility. *Reprod. Biol. Endocrinol. RBE* **16**, (2018).
73. Lwow, F., Medraś, M., Słowińska-Lisowska, M., Józków, P. & Szmigiero, L. The Effect of Occasional Alcohol Drinking on Semen Quality and Sperm Morphology among Young and Healthy Polish Men. *J. Mens Health* **13**, e16–e24 (2017).
74. Jensen, T. K. *et al.* Habitual alcohol consumption associated with reduced semen quality and changes in reproductive hormones; a cross-sectional study among 1221 young Danish men. *BMJ Open* **4**, e005462 (2014).
75. Bracken, M. B. *et al.* Association of cocaine use with sperm concentration, motility, and morphology. *Fertil. Steril.* **53**, 315–322 (1990).
76. Zhou, J. *et al.* The Semen pH Affects Sperm Motility and Capacitation. *PLoS ONE* **10**, (2015).
77. Despacho n.º 3192/2017 de 11 de Abril - Diário da República n.º 75/2017, Série II de 2017-04-17, páginas 7192 - 7193.
78. Almeling, R. The Business of Egg and Sperm Donation. *Contexts* **16**, 68–70 (2017).

79. Mohr, S. Beyond motivation: on what it means to be a sperm donor in Denmark. *Anthropol. Med.* **21**, 162–173 (2014).
80. Thijssen, A. *et al.* Motivations and attitudes of candidate sperm donors in Belgium. *Fertil. Steril.* **108**, 539–547 (2017).
81. Roberts, M. & Jarvi, K. Steps in the investigation and management of low semen volume in the infertile man. *Can. Urol. Assoc. J.* **3**, 479–485 (2009).