



DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Influência dos abusos estudantis durante os festejos académicos nos espermatozóides

Dissertação apresentada à Universidade de Coimbra para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biologia, realizada sob a orientação científica do Professor Doutor João Ramalho-Santos (Universidade de Coimbra).

Ana Karina Lopes Almeida

2012

Agradecimentos

Ao meu orientador, Professor Doutor João Ramalho Santos, pelo apoio que me ofereceu nos tempos mais difíceis do meu trabalho e que foi tão fundamental para o poder concluir.

À Ferticentro, por me permitir a realização do estágio e tese de mestrado, por tudo o que aprendi com a sua equipa de trabalho, especialmente, com a Sílvia e a Inês, que me prestaram apoio na tese e me ensinaram o que sei nesta área.

Um agradecimento muito grande e especial à minha mãe, por todo o esforço que teve para que eu chegasse até aqui e pelo apoio e amor que nunca encontrarei em mais nenhum lugar. Por estes e por outros motivos vai ser sempre o meu pilar. Ao meu pai, que mesmo estando longe, está sempre por perto e apoiando à sua maneira, obrigada.

Ao Tiago, pelo amor, amizade e um sem fim de sentimentos que fomos construindo ao longo de todos estes anos (e também pela sua participação neste projecto =P). Vai ser sempre uma das pessoas mais especiais que “tenho“.

Às pessoas amigas, que tanto me ajudaram neste trabalho e que estão sempre dispostas a ajudar em qualquer coisa que precisar. Marta, por me teres ajudado tanto neste trabalho e em todo o meu percurso académico, deste cor à minha Biologia! Dulce Pik, pelas noções de estatística e por estares sempre pronta a transmitir todo o conhecimento que tens; Francisco, pela tua ajuda nos vários percalços que surgiram nesta tese e por seres um grande amigo.

A outros amigos que, mesmo não estando envolvidos directamente na tese, têm ajudado a dar apoio no dia-a-dia. À Dianita, que me acompanhou mais de perto nestas últimas fases de maior angústia, por me alegrar e animar nos momentos mais baixos que

me invadiram; à Marcia, namorada incondicional que tem estado presente nos bons e nos maus momentos, que a nossa amizade seja sempre como tem sido até agora. À Ana, irmã escolhida por mim; aos meus irmãos de sangue que tanto adoro (Miky, Mony e Arturo), à Estela, Ritinha, Susana (um obrigado muito especial!), e muitas pessoas que posso não nomear mas que estão sempre presentes.

Por último, um agradecimento enorme a todos os participantes, sobretudo ao pessoal amigo, do projecto “Para o Frasco”. Sem eles não seria possível a realização deste trabalho, valeu!

Índice

Abreviaturas	- 5 -
Resumo	- 6 -
Abstract	- 8 -
Capítulo 1 - Introdução.....	- 10 -
1.1 - Reprodução humana – Criação de uma nova Vida	- 11 -
1.2 - Gâmeta masculino - O espermatozóide.....	- 11 -
1.2.1 – História do espermatozóide	- 11 -
1.2.2 – Morfologia e fisiologia do espermatozóide	- 11 -
1.3 – Espermatogénese e Espermiogénese	14
1.4 - Avaliação da qualidade de uma amostra de esperma – Espermograma.....	19
1.4.1 - Análise seminal macroscópica.....	21
1.4.1.1 – Viscosidade do ejaculado	21
1.4.1.2 – Aparência do ejaculado	21
1.4.1.3 – Volume do ejaculado	22
1.4.1.4 – pH do ejaculado.....	22
1.4.2 Análise seminal microscópica	23
1.4.2.1 - Concentração espermática.....	23
1.4.2.2 Mobilidade espermática	23
1.4.2.3 Morfologia espermática.....	25
1.4.3– Presença de células não espermáticas no ejaculado	27
1.4.4 - Vitalidade espermática.....	27
1.5 – Avaliação da maturação espermática.....	28
1.6 – Consumo de álcool em Portugal.....	29
1.6.1 - Efeito do consumo de álcool e drogas na espermatogénese	30
1.7 – Objectivos.....	32
Capítulo 2 – Materiais e Métodos	33
2.1 – Materiais e reagentes	34
2.2 – Material biológico	34
2.3 – Desenho experimental	35
2.4 – Avaliação da mobilidade espermática	37
2.5 – Avaliação da concentração espermática.....	38
2.6 – Avaliação da morfologia espermática.....	40
2.7 – Avaliação da maturação espermática.....	42

2.8	- Análise estatística	43
Capítulo 3	- Resultados	44
3.1	- Avaliação da alteração dos hábitos de consumo durante a queima das fitas	45
3.1.1	- Alteração no consumo de álcool:	45
3.1.2	- Alteração no consumo de tabaco:	45
3.1.3	- Alteração no consumo de drogas:	46
3.2	- Influência do consumo de álcool, drogas e tabaco na concentração espermática	47
3.3	- Influência do consumo de álcool, drogas e tabaco na mobilidade progressiva espermática	48
3.4	- Influência do consumo de álcool, drogas e tabaco no volume seminal.....	49
3.5	- Influência do consumo de álcool, drogas e tabaco na maturação espermática .	50
3.6	- Influência do consumo de álcool, drogas e tabaco na morfologia espermática .	51
3.7	- Avaliação de parâmetros espermáticos em fumadores e não fumadores.....	53
3.7.1	- Concentração espermática em fumadores e não-fumadores.....	53
3.7.2	- Mobilidade progressiva espermática em fumadores e não-fumadores.....	54
3.7.3	- Morfologia espermática normal em fumadores e não-fumadores	55
3.7.4	- Ligação ao ácido hialurônico em fumadores e não-fumadores	56
Capítulo 4	- Discussão	57
4.1	- Influência do consumo de tabaco sobre os parâmetros espermáticos	58
4.2	- Influência do consumo de álcool sobre os parâmetros espermáticos	59
4.3	- Influência do consumo de drogas sobre os parâmetros espermáticos	60
4.4	- Estudo das alterações dos parâmetros espermáticos	61
Capítulo 5	- Conclusões finais.....	64
Capítulo 6	- Referências bibliográficas.....	66
Capítulo 7	- Anexos	70

Abreviaturas

% - Percentagem

ADN – Ácido Desoxirribonucléico

ATP – Adenosina tri-fosfato

Cálcio – Ca^{2+}

Carbono – C

DDT - Dicloro-Difenil-Tricloroetano

FSH – Hormona Folículo estimulante

GnRH – Gonadotrofinas

HPG – Eixo Hipotálamo-Hipófise-Gonadal

LH – Hormona Luteinizante

Técnicas de Reprodução Assistida – TRA

OMS – Organização Mundial da Saúde

ROS – Espécies reactivas de oxigénio

SPZ – Espermatozóides

WHO - World Health Organization

Zn – Zinco

ZP – Zona Pelúcida

Resumo

A espermatogénese e a espermiogénese são processos complexos de divisão e diferenciação celular, respectivamente, cujo principal objectivo é gerar espermatozóides capazes de fecundar o gâmeta feminino, o ovócito. O número de espermatozóides produzidos diariamente é uma medida da eficácia da espermatogénese. Este processo envolve três fases fundamentais: mitose, meiose e espermiogénese ou fase de diferenciação celular. Esta última representa o período de maior alteração celular. A meiose é normalmente considerada a fase de maior importância do processo de espermatogénese, no entanto, vários estudos mostraram que as fases pré e pós-meióticas são igualmente relevantes. A fertilização humana está dependente da arquitectura extremamente especializada e das modificações complexas a nível celular apresentadas pelos espermatozóides.

Pesquisas recentes apontam para uma diminuição significativa dos parâmetros seminais, ao longo das últimas décadas. O aumento acentuado do consumo de álcool e drogas de abuso pela população mundial, assim como pela população portuguesa, parecem conduzir a um aumento da infertilidade. Deste modo, avaliou-se o efeito do consumo de álcool, drogas e tabaco sobre os parâmetros espermáticos durante a Queima das Fitas, uma época de consumos exagerados.

A qualidade espermática, neste estudo, foi analisada de acordo com os critérios convencionados pela Organização Mundial da Saúde. Parâmetros espermáticos (vitalidade, motilidade, concentração e morfologia) e a composição do fluido seminal são relevantes para o desenvolvimento normal da função do espermatozóide, resultado da acção conjunta de diversos factores.

A avaliação da maturação espermática, não incluída na análise básica seminal – o espermograma – é, neste estudo, abrangida como parâmetro fundamental de avaliação. Os efeitos do álcool e das drogas apresentaram maiores repercussões na maturação espermática, afectando a capacitação espermática e presumivelmente a capacidade de fertilização. A inclusão deste parâmetro na análise das amostras parece pois fundamental.

Os resultados obtidos apontam para uma influência negativa do consumo exagerado de álcool, drogas e tabaco sobre dois parâmetros espermáticos, a morfologia e maturação espermática. Quanto aos outros parâmetros, concentração, mobilidade e volume seminal não foram encontrados efeitos negativos, na medida em que os resultados obtidos não apresentaram diferenças estatisticamente significativas.

Através dos resultados deste estudo podemos auferir que o consumo exagerado de álcool, drogas e tabaco, parece provocar a diminuição de formas espermáticas normais e da maturação espermática.

Contudo, mais estudos (mais controlados e com mais amostras) são necessários para conhecer o efeito do álcool e drogas na fertilidade masculina, de modo a poderem ser combatidos e evitados muitos problemas de infertilidade.

Abstract

Spermatogenesis and spermiogenesis are complex processes of cell division and differentiation, respectively, resulting in the production of functional sperm that can fertilize the female gamete, the oocyte. The number of spermatozoas produced each day is a measure of the effectiveness of spermatogenesis. This process involves three main phases: mitosis, meiosis and spermiogenesis or stage of cell differentiation. The latter represents the period of greatest cellular changes. Meiosis is usually considered the most important phase of the spermatogenic process, however, several studies have shown that the pre-and post-meiotic events are equally relevant. Human fertilization is dependent on the architecture of the highly specialized and complex changes at the cellular level provided by the sperm.

Recent research points to a significant decrease in semen parameters over the last decades, especially in the West. The increase in the consumption of alcohol and drugs by the world population, as well as by the Portuguese population, seem to lead to an increase in infertility. Thus, we evaluated the effect of alcohol, drugs and smoking on sperm parameters during the *Queimas das Fitas*, a time of exaggerated consumption of these substances.

Sperm quality was analyzed according to criteria provided by the World Health Organization. Sperm parameters (vitality, motility, concentration and morphology) and composition of seminal fluid are relevant to the development of normal sperm function, which is the result of the joint action of several factors.

The evaluation of sperm maturation is not included in the basic semen analysis, which comprises the spermiogram. This study covered this parameter of evaluation. The consumption of alcohol and drugs showed a greater effect on sperm maturation,

affecting sperm capacitation and thus fertilization ability monitored using a hyaluronic acid binding assay. Therefore, the inclusion of this parameter in the analysis of samples is essential.

The results indicate a negative influence of excessive consumption of alcohol, drugs and tobacco on two sperm parameters, sperm morphology and maturation. No significant effects. The results of this study show that the excessive consumption of alcohol, drugs and tobacco, may cause a decrease of normal sperm forms and sperm maturation.

However, further controlled studies with more samples are needed to reveal the influence of alcohol and drugs on male fertility. These aspects are important to avoid and treat many infertility problems.

Capítulo 1 - Introdução

1. Introdução

1.1 - Reprodução humana – Criação de uma nova Vida

Como os animais, os seres humanos precisam de se reproduzir. Através da combinação do seu material genético, homens e mulheres de todas as gerações asseguram a continuidade da espécie. Embora os seres humanos tenham vidas reprodutivas mais longas e períodos de fertilidade muito mais frequentes do que a maioria das espécies, reproduzimo-nos relativamente devagar (Mohum, 2005).

1.2 - Gâmeta masculino - O espermatozóide

1.2.1 – História do espermatozóide

Os espermatozoides foram descobertos por cientistas em finais do século XVII. Nos círculos científicos dizia-se que cada espermatozóide continha um ser humano minúsculo mas completamente formado, com o nome de homúnculo. Depois de entrar no corpo da mulher, o homúnculo seria incubado e daria origem a um bebé. Só na década de 40, do séc. XIX, os cientistas perceberam de que modo o espermatozóide entra no corpo da mulher e, depois da fertilização, dá origem ao embrião (Mohum, 2005).

1.2.2 – Morfologia e fisiologia do espermatozóide

A palavra espermatozóide designa a célula sexual masculina cuja principal função é transmitir a informação genética, de origem paterna, para a geração seguinte. Os processos pelos quais ocorre a formação e especialização destas células recebem o nome de espermatogénese e espermiogénese, respectivamente, e ocorre no interior dos testículos, mais especificamente, nos túbulos seminíferos (Figura 1).

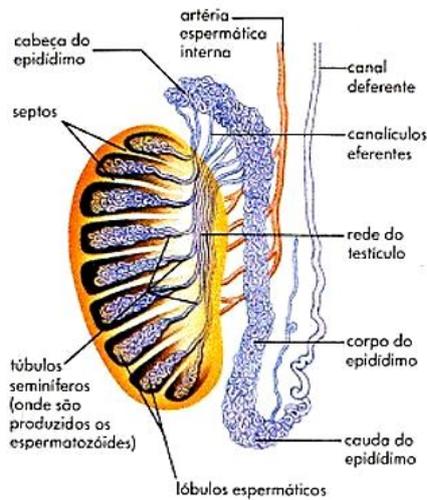


Figura 1 – Imagem do testículo humano, gónada sexual masculina (adaptado de <http://fertilizacaoinvitro.wordpress.com>).

As características estruturais altamente especializadas dos espermatozóides são reflexo das suas actividades funcionais únicas (Mohum, 2005).

O tamanho do espermatozóide é um parâmetro específico de cada espécie. No caso do Homem, o comprimento de um gâmeta masculino é em média 60 μm , podendo, por exemplo, no rato chegar aos 190 μm (Ramalho-Santos et al, 2007). A célula espermática é constituída por três elementos – a cabeça, a peça intermédia e o flagelo ou cauda (Figura 2).

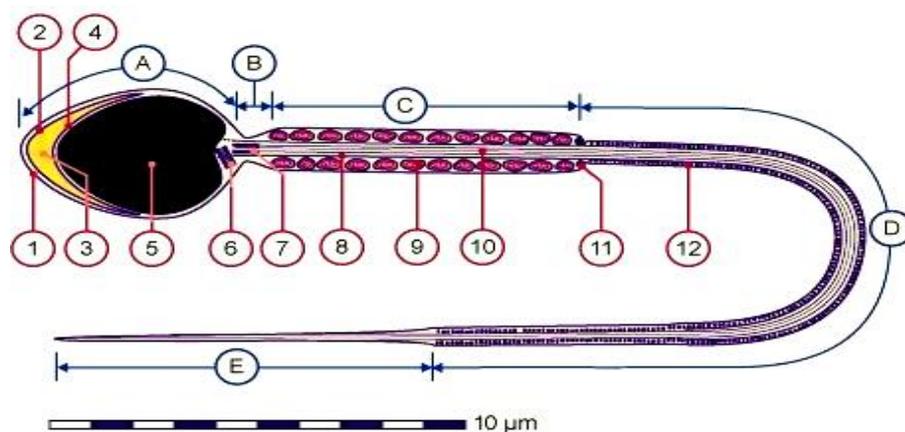


Figura 2 – Representação esquematizada da célula sexual masculina e os seus constituintes (adaptado de WEB Portfólio de Embriologia 2008).

Legenda: 1 – Membrana plasmática; 2 – Membrana externa do acrossoma; 3 – Acrossoma; 4 – Membrana interna do acrossoma; 5 – Núcleo; 6 – Centríolos; 7

– Restos do citoplasma distal; **8** – Feixes longitudinais densos; **9** – Mitocôndrias; **10** – Axonema; **11** – Anel; **12** – Fibras externas densas; **A** – Cabeça; **B** – Colar; **C** – Peça intermédia; **D** – Parte anterior da cauda; **E** - Parte posterior da cauda.

A cabeça do espermatozóide, situada na região anterior da célula, contém o núcleo e o acrossoma: o núcleo tem uma cópia de cada cromossoma com a cromatina altamente condensada e estável. Por sua vez, a cromatina consiste em ADN (Ácido Desoxirribonucléico) e proteínas nucleares, nomeadamente protaminas, proteínas nucleares que compactam, estabilizam e protegem o material genético para uma correcta fertilização do ovócito (Wykes et al., 1997), possui um arranjo complexo de ADN e macromoléculas com diferentes níveis de compactação (Getzenberg et al., 1991; Fuentes-Mascorro et al., 2000). O acrossoma, situado na região anterior da cabeça, ocupa 40 a 70% da sua área total e protege esta parte do espermatozóide. Está envolvido por uma membrana e contém enzimas hidrolíticas cuja função é permitir a digestão e a penetração do espermatozóide na zona pelúcida do ovócito (WHO, 2010).

A peça intermédia, que estabelece a ligação entre a cabeça e a cauda do espermatozóide, é constituída por mitocôndrias dispostas em hélice à volta das fibras densas. É aqui o local de produção de energia biológica, Trifosfato de Adenosina (ATP), que promove o movimento flagelar da célula. Ainda na peça intermédia encontramos a região anterior do flagelo com o axonema, parte motora do flagelo, constituído por 2 microtúbulos centrais e 9 microtúbulos periféricos que emanam do centríolo na base do núcleo do espermatozóide ($9_2 + 2_2$) (WHO, 2010).

Por último, a cauda ou flagelo do espermatozóide, criadora da força motriz necessária para que a célula sexual masculina consiga nadar até ao ovócito e penetre a

zona pelúcida, é constituída por um axonema central rodeado de fibras densas (Gilbert 2006). O flagelo, tal como a cabeça, encontra-se envolvido pela membrana citoplasmática e apresenta baixo conteúdo em citoplasma.

1.3 – Espermatogénese e Espermiogénese

A espermatogénese e a espermiogénese correspondem, respectivamente, aos processos de formação e alteração da morfologia de um espermatozóide. Em cada espécie de mamíferos, o tempo necessário para completar estes processos é único e inalterável (França et al., 1998).

A espermatogénese é o principal evento fisiológico que ocorre nos túbulos seminíferos, unidades funcionais dos testículos que produzem espermatozoides (Cheng , Wong, & Cheng , 2011). No caso do Homem, este processo celular tem início na puberdade e estende-se, de forma ininterrupta, até ao resto da vida do indivíduo. A produção espermática, no Homem, ronda os 120 milhões de espermatozoides/dia (Mohum, 2005).

De uma forma simplificada, definimos a espermatogénese como o processo onde, partindo de células germinais – as espermatogónias – se obtêm os espermatozoides, células sexuais masculinas, capazes de transportar o seu conteúdo cromossómico para a geração seguinte. O processo de espermatogénese engloba 4 fases sucessivas: germinativa (multiplicação), crescimento, maturação e diferenciação (Figura 3).

Inicialmente, na fase de multiplicação, as células germinais (espermatogónias) sofrem divisões mitóticas sucessivas. Estas células diplóides ($2n=46$), localizadas na

periferia dos túbulos seminíferos, sofrem proliferação durante toda a vida do indivíduo. As células resultantes podem continuar a divisão, mantendo-se como espermatogônias tipo A (células estaminais do testículo) ou podem diferenciar-se em espermatogônias do tipo B (células precursoras).

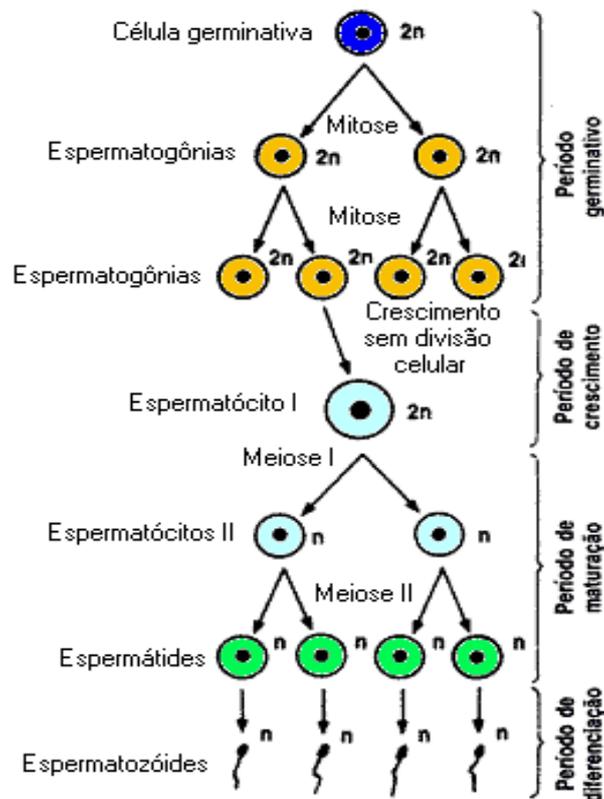


Figura 3 – Representação esquemática do processo de espermatogênese com os diferentes estádios de desenvolvimento (adaptado de Fox, 2004).

Durante a fase de crescimento, as espermatogônias aumentam o seu volume devido à acumulação de substâncias de reserva necessárias para a meiose. Desta fase resultam os espermatócitos I ou, também designados, espermatócitos de 1ª ordem.

A fase de maturação, assinalada pela primeira divisão meiótica, reduz a carga cromossômica da célula a metade, passando de célula diplóide ($2n$) a haplóide (n). Os espermatócitos II, resultantes da primeira meiose, sofrem uma segunda divisão meiótica resultando em 4 células haplóides – os espermatídeos. Após a segunda meiose inicia-se a espermiogénese ou fase de diferenciação (Figura 4), e com ela, a formação do acrossoma, a condensação e alongamento do núcleo, formação do flagelo e a perda da maior parte do citoplasma. No final desta fase os espermatozóides são libertados no lúmen dos túbulos seminíferos e, de seguida, encaminhados para o epidídimo onde culminam o seu processo de maturação, adquirindo motilidade e capacidade fecundante.

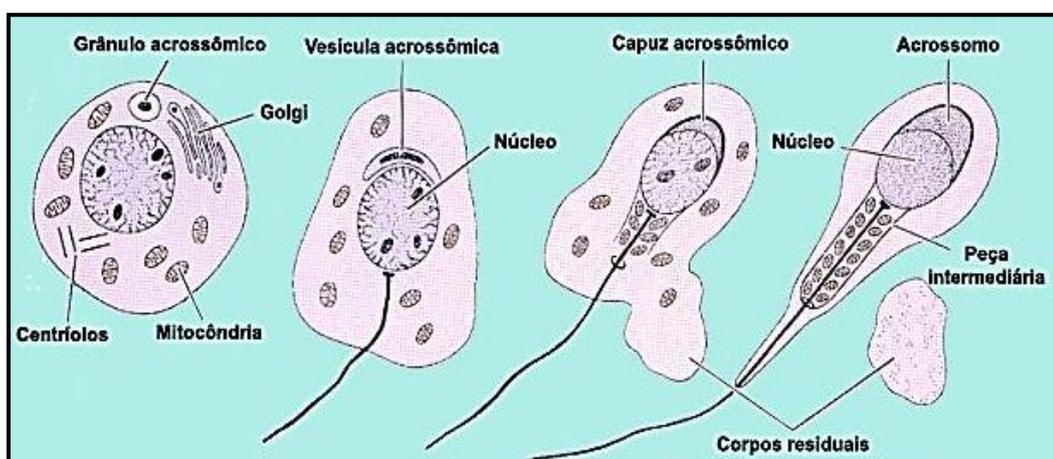


Figura 4 – Representação esquemática do processo de espermiogénese (adaptado de http://embriologia_NOVO/C-Gametogenese_masculina).

É relevante referir que o processo de espermatogénese está regulado, de forma intrínseca, pelas células de Sertoli e pelas células de Leydig, e de forma extrínseca, pelo eixo Hipotálamo-Hipófise-Gonadal (De Kretser & Kerr, 1994) (Figura 5).

As células de Leydig são responsáveis pela produção de andrógenos, neste caso, Testosterona. A hormona luteinizante (LH) tem acção sobre estas células, estimulando a produção de testosterona que é necessária para o desenvolvimento normal das células

germinais espermatogénicas. A hormona testosterona incita a adesão dos espermatídeos às células de Sertoli, de forma a manter os espermatozóides viáveis após a sua libertação no lúmen (De Kretser & Kerr, 1994).

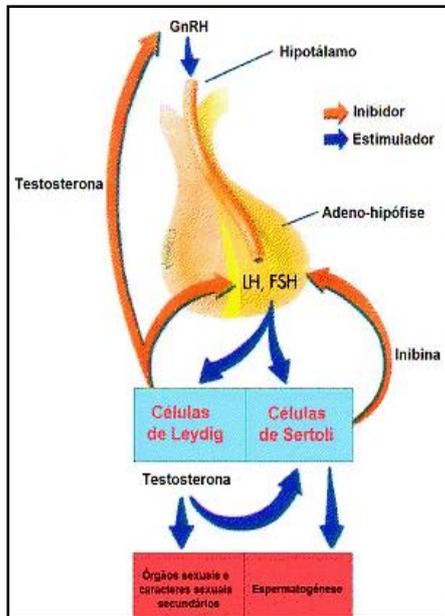


Figura 5 – Representação esquemática do Eixo Hipotálamo-Hipófise-Gonadal (adaptado de Fox, 2004).

Por sua vez, as células de Sertoli, encontradas no epitélio seminífero, e intimamente ligadas às células da linha germinativa, desempenham um papel relevante na formação da barreira hemato-testicular, providenciando suporte estrutural, metabólico e nutricional às células germinais durante a espermatogénese. À medida que as células germinais se vão diferenciando, ocupam posições sucessivamente mais próximas do lúmen do túbulo seminífero, envolvidas por prolongamentos citoplasmáticos das células de Sertoli. Para além das funções de suporte, estas células possuem ainda capacidade fagocítica, permitindo-lhes digerir o citoplasma residual das espermatídes, resultante da espermiogénese e, do mesmo modo, fagocitar as células germinativas em degeneração.

No entanto, os mecanismos moleculares e bioquímicos que regulam a espermatogénese, no epitélio seminífero, permanecem largamente inexplorados (Cheng, Wong, & Cheng, 2011).

Quando a espermatogénese se encontra comprometida, os mecanismos de extrusão citoplasmática apresentam defeitos, de modo que os espermatozóides libertados pelo epitélio germinal apresentam um excesso de citoplasma – ECR – Excesso de Citoplasma Residual. Acredita-se que, e nestas circunstâncias, as células espermáticas libertadas aquando do processo de espermatogénese sejam imaturas e funcionalmente defeituosas. (Jayalekshmi, 2006).

1.4 - Avaliação da qualidade de uma amostra de esperma – Espermograma

O esperma, também designado sémen, consiste numa suspensão de espermatozóides, células sexuais masculinas, em secreções provenientes dos testículos e epidídimo que, aquando da ejaculação, são combinados com secreções provenientes de glândulas anexas, tais como, próstata, vesículas seminais e glândula bulbo-uretral (WHO, 2010).

Por razões de padronização e para que resultados obtidos em locais diferentes sejam comparáveis e confiáveis, os testes que envolvem esperma devem ser realizados de acordo com directrizes, como as estabelecidas pela Organização Mundial de Saúde (OMS) ou World Health Organization (WHO).

Desta forma, a qualidade de uma amostra de esperma é avaliada tendo em conta os parâmetros estipulados pela OMS, através da realização de um espermograma, exame não invasivo que costuma ser solicitado de antemão para avaliar a fertilidade dos casais. Note-se que, a análise seminal não é, isoladamente, um teste de fertilidade.

Neste exame são avaliados parâmetros macroscópicos e microscópicos com o intuito de estimar, de forma minuciosa, a qualidade de cada amostra. Nesta análise, avalia-se, simultaneamente, a função testicular, as propriedades funcionais dos espermatozóides, a maturação epididimária e a função secretora das glândulas anexas.

O espermograma deve ser efectuado logo após o intervalo de liquefacção, entre 30 a 60 minutos, mas nunca ultrapassando uma hora após a ejaculação, de modo a impedir efeitos negativos da alteração da temperatura sobre a amostra. Seguidamente a este intervalo avaliam-se os parâmetros macroscópicos – aparência visual (cor, opacidade), liquefacção, viscosidade, volume (ml), pH, presença de grumos gelatinosos ou muco (WHO, 2010).

De seguida, e de forma mais meticulosa, avaliam-se os parâmetros microscópicos – concentração em espermatozóides (milhões/ml), mobilidade, morfologia, presença de agregados/aglutinados, presença de outros tipos celulares como leucócitos, células germinais (imaturas), eritrócitos e/ou restos citoplasmáticos (WHO, 2010).

A vitalidade, parâmetro adicional segundo a OMS, é avaliada apenas em casos onde o soma da mobilidade progressiva (MP) e mobilidade não progressiva (MNP) é inferior a 40% (WHO, 2010).

Dos parâmetros anteriormente citados, os mais importantes na avaliação da qualidade espermática são: a concentração, a mobilidade e a morfologia. Porém, parâmetros como a vitalidade e a ligação ao ácido hialurónico podem contribuir com informação complementar relevante no diagnóstico da infertilidade do casal (Kovacs, Kovacs, Sajgo, Kaali, & Szollosi, 2010).

A análise básica do sémen determina, principalmente, a contagem de espermatozóides, motilidade e morfologia, não avaliando muitos outros aspectos da função espermática como seja a maturidade nuclear, a constituição normal do ADN e a capacidade dos espermatozóides para atingir o ócito (Liu e Baker, 1992b; Cayli *et al.*, 2003, 2004; Huszar *et al.*, 2003). Por conseguinte, novos testes espermáticos têm sido desenvolvidos, tais como, o teste HBA – The perm-Hyaluronan-Binding Assay - diagnóstico comercial para avaliar a maturidade e funcionalidade espermática (Cayli *et al.*, 2003, 2004; Huszar *et al.*, 2003).

1.4.1 - Análise seminal macroscópica

Numa primeira análise e à vista desarmada, isto é, sem o auxílio de microscópio óptico, avaliam-se os parâmetros macroscópicos.

Segundo dados estipulados pela WHO (2010), as características macroscópicas avaliadas numa amostra seminal apresentam-se em seguida.

1.4.1.1 – Viscosidade do ejaculado

Este parâmetro é avaliado após a liquefacção e com o auxílio de uma pipeta de plástico descartável, deixando cair uma gota de amostra e analisando se ocorre a formação de algum segmento. Numa amostra normal, as gotas caem pela força da gravidade, mas no caso de amostras com viscosidade aumentada formam-se segmentos com pelo menos 2 cm de comprimento. A viscosidade elevada pode interferir com a determinação da motilidade e da concentração espermática (WHO, 2010).

1.4.1.2 – Aparência do ejaculado

Uma amostra de sémen normal, e com liquefacção completa, apresenta uma cor cinza opalescente, podendo também aparecer menos opaca em casos onde a concentração espermática é muito baixa. Se a amostra apresentar uma tonalidade vermelho-acastanhada, pode indicar a presença de células do sangue (Haemospermia), ou uma tonalidade amarelada em casos de icterícia e/ou devido à administração de certas vitaminas ou drogas (WHO, 2010).

1.4.1.3 – Volume do ejaculado

O volume do ejaculado depende, sobretudo, da actividade das vesículas seminais e da próstata, com uma contribuição menos significativa das glândulas bulbo-uretrais e epidídimos. Com o auxílio de uma pipeta graduada, aspira-se a amostra do frasco de recolha e, com o máximo de rigor, regista-se o volume de esperma em mililitros. Segundo dados estipulados pela WHO, o volume mínimo de sémen numa amostra normal é 1,5ml (WHO, 2010).

1.4.1.4 – pH do ejaculado

O pH da amostra reflecte o equilíbrio entre os valores do pH das secreções das glândulas acessórias, principalmente a secreção alcalina das vesículas seminais e a secreção ácida da próstata. Este parâmetro deve avaliar-se, preferencialmente, 30 minutos após a ejaculação, uma vez que o seu valor é influenciado pela alteração dos níveis de CO₂. Em amostras normais o intervalo do pH varia de 6 a 10 (WHO, 2010).

Efectuada esta análise prévia, procede-se a uma avaliação mais minuciosa, recorrendo ao microscópio óptico e a técnicas colorimétricas.

1.4.2 Análise seminal microscópica

1.4.2.1 - Concentração espermática

O número de espermatozóides presentes no ejaculado calcula-se a partir da concentração espermática, parâmetro directamente relacionado com o volume seminal (Handelsman et al, 1984; OMS, 1987; Andersen et al, 2000;. Behre et al, 2000) sendo, portanto, uma medida da capacidade produtora dos testículos (MacLeod & Wang, 1979). A concentração espermática não é sinónima do número total de espermatozóides. A primeira refere-se ao número de espermatozóides por unidade de volume de amostra, e o número total de espermatozóides obtém-se multiplicando a concentração espermática pelo volume total do ejaculado (WHO, 2010).

Dados convencionados pela OMS (2010) indicam que, uma amostra para ser considerada normal –normozoospermica- tem que apresentar, pelo menos, 15 milhões de espermatozóides/ml. Amostras com valores inferiores a este são catalogadas oligozoospermicas.

1.4.2.2 Mobilidade espermática

O movimento flagelar coordenado do espermatozóide é adquirido após a sua maturação no epidídimo, permitindo-lhe viajar, através do tracto reprodutor feminino, ao encontro do oócito, com o objectivo final de fecundação (WHO, 2010).

Contudo, a aquisição desta aptidão não ocorre de forma sincronizada, no que respeita ao local e ao período, explicando assim a grande diversidade de padrões de movimento encontrados numa amostra seminal.

Este parâmetro de avaliação é bastante importante na medida em que está directamente relacionado com a taxa de gravidez (Jouannet et al, 1988;. Larsen et al, 2000;.. Zinaman et al, 2000). A mobilidade espermática é o primeiro parâmetro a avaliar dentro das funções do espermatozóide, devendo analisar-se logo após o intervalo de liquefacção, com a maior brevidade possível, de modo a limitar os efeitos adversos da descida da temperatura e da variação do pH.

Existe um sistema de classificação, estipulado pela WHO, com três categorias, onde se encaixam os diferentes tipos de mobilidade dos espermatozoides,

- Mobilidade progressiva (PR)
- Mobilidade *in situ* (NP)
- Imobilidade (IM)

Quando se discute a motilidade dos espermatozoides, é importante especificar a motilidade total (PR + NP) ou motilidade progressiva (PR) (WHO, 2010). Todavia, para os técnicos, existe uma grande dificuldade em distinguir com precisão a trajectória dos espermatozoides (Cooper & Yeung, 2006).

Desta forma, é sugerível contabilizar primeiro os espermatozoides que apresentam Mobilidade Progressiva Rápida de forma a evitar a contagem duplicada das células. De seguida, contabilizam-se os espermatozoides com Mobilidade Não-Progressiva e, por último, os espermatozoides Imóveis.

Segundo dados estabelecidos pela WHO (2010), para que uma amostra seminal seja considerada normal, terá que apresentar, pelo menos, 32% de espermatozoides com mobilidade progressiva. Se tal não se verificar, nesse caso, a amostra é categorizada Astenozoospermica. A progressividade refere-se à capacidade que o espermatozóide

tem em “percorrer um caminho”, enquanto a mobilidade apenas diz respeito à aptidão do espermatozóide para se movimentar, ainda que seja no mesmo sítio (mobilidade *in situ*). Para o espermatozóide ser capaz de alcançar o ovócito, é mais importante uma boa progressividade do que uma boa mobilidade.

1.4.2.3 Morfologia espermática

Este parâmetro é sensível à qualidade do espermatozóide e nele se avalia o formato da cabeça, peça intermédia e cauda.

Para avaliar este parâmetro, efectua-se um esfregaço da amostra seminal, aplicando-se de seguida a técnica colorimétrica, rápida, simples e largamente usada nos laboratórios de andrologia e infertilidade –Diff-Quik – usando um fixador, o metanol, de seguida, um primeiro corante aniónico/acídico – Eosina - que cora as proteínas positivamente carregadas/básicas de vermelho e por último, um segundo corante – Nigrosina – que gera um contraste entre as células e o fundo claro do microscópio (Figura 6).

A avaliação da morfologia segue o critério estrito de Tygerberg (originalmente descrito por Kruger *et al.*, 1986), rigoroso critério de classificação. Considera-se que uma amostra de esperma é normal quando existem, pelo menos, 4% de espermatozóides com forma normal. Caso contrário, estamos na presença de uma teratozoospermia. Um espermatozóide considerado normal apresenta (WHO, 2010): - Cabeça com 4–5µm de comprimento e 2,5–3,5µm de largura, forma oval, lisa, regular e com uma região apical mais clara, região acrossómica, e uma região mais escura correspondente ao núcleo.

- Peça intermédia, (comprimento de 7-8 μm e largura superior à da cauda) unida axialmente à cabeça; pode conter restos citoplasmáticos (que não foram eliminados durante a espermatogénese) cuja área não deve ser superior a metade da área da cabeça;

- Cauda recta, uniforme e desenrolada, com 45 μm de comprimento.

Todos os espermatozóides que apresentem desvios à morfologia ideal são classificados como anormais, sendo possível uma célula apresentar mais do que uma anomalia e em mais de uma das suas partes constituintes (WHO, 2010).

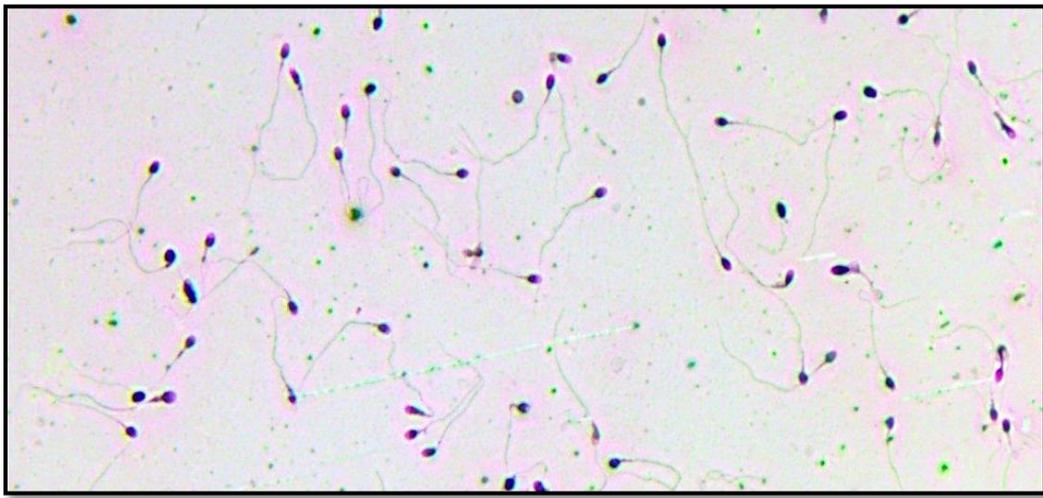


Figura 6 – Fotografia de espermatozóides, tirada ao microscópio de fluorescência, com a aplicação da técnica colorimétrica Diff-Quik®, ampliado 200X.

Apenas se contabilizam espermatozóides completos, isto é, constituídos por cabeça, peça intermédia e cauda. Espermatozóides que apresentem apenas cabeça ou apenas cauda devem ser registados no espermograma mas não são tidos em conta como anomalias de cauda ou de cabeça, respectivamente (WHO, 2010). A presença de restos citoplasmáticos com área superior a metade da área da cabeça do espermatozóide também é considerada uma anomalia morfológica.

1.4.3– Presença de células não espermáticas no ejaculado

Uma amostra seminal contém outras células para além de espermatozóides, podendo algumas delas ter significado clínico importante. Estas células incluem células epiteliais do tracto genital e urinário, assim como leucócitos e células germinais imaturas, sendo estas duas últimas referidas como “células redondas” (Johanisson et al., 2000).

1.4.4 - Vitalidade espermática

A vitalidade, por sua vez, é um parâmetro adicional que distingue espermatozóides vivos de mortos, mas é um elemento chave da qualidade espermática (Garner et al., 1994), sendo muito utilizada para observar o estado do sistema reprodutor masculino e a qualidade de esperma em várias situações, entre elas na avaliação de substâncias tóxicas para o organismo (Gravance et al., 2001).

A vitalidade avalia-se apenas quando a percentagem de espermatozóides imóveis excede os 60%. De acordo com a Organização Mundial da Saúde (2010), uma amostra de esperma é considerada normal quando existem pelo menos 58% de espermatozóides vivos. A razão subjacente a este critério é a diferenciação de espermatozóides mortos dos que são apenas imóveis mas vivos (WHO, 2010).

Uma das técnicas amplamente utilizadas na avaliação deste parâmetro é o teste óptico da eosina-nigrosina. Partindo do princípio que a membrana plasmática intacta de um espermatozóide não é permeável à eosina, um espermatozóide que possua esta estrutura celular danificada incorpora o corante e apresenta uma coloração vermelha (não viável). A nigrosina, por sua vez, fornece o contraste, no fundo claro do microscópio, necessário para a visualização de espermatozóides vivos (não corados).

1.5 – Avaliação da maturação espermática

A análise convencional de espermatozoides, baseada na concentração, motilidade e morfologia, é largamente usada como indicador de fertilidade masculina. Contudo, os resultados não providenciam informações precisas acerca da fertilidade masculina, seja *in vivo* ou *in vitro* (Mahadevan and Trouson, 1984; Zaini et al., 1985; Jeulin et al., 1986; Silber, 1989; Liu and Baker, 1992^a; ESHRE Andrology Special Interest Group, 1996; World Health Organization, 1999; Guzick et al., 2001).

No processo de fertilização natural, os espermatozoides maduros ligam-se ao ácido hialurônico, polissacárido linear, principal componente da matriz do *cumulus oophorus*; ao contrário dos espermatozoides imaturos que são incapazes de se ligar a este (Ye, Huang, Gao, & Liu, 2006). Recentemente, desenvolveu-se um teste de grande simplicidade, Sperm-hyaluronan-binding assay (HBA), kit comercial para diagnóstico da função e maturação espermática (Cayli et al., 2003, 2004; Huszar et al., 2003).

Estudos, previamente feitos nesta área, revelaram uma capacidade do ácido hialurônico para seleccionar espermatozoides com maior integridade de ADN nuclear e melhor morfologia. No entanto, o valor clínico do ensaio HBA, em termos de infertilidade masculina, parece ser limitado (Kovacs, Kovats, Sajgo, Kaali, & Szollosi, 2010). Assim, a habilidade que o espermatozoide possui para se ligar ao ácido hialurônico pode ser aplicada como avaliação da maturidade espermática, na medida em que o gameta feminino – o óvulo – se encontra recoberto por esta substância química.

De facto, os espermatozoides que se ligam ao ácido hialurônico apresentam taxas de fragmentação de ADN muito baixas, morfologia normal e baixas taxas de aneuploidia (Kovacs, Kovats, Sajgo, Kaali, & Szollosi, 2010).

Estudos revelam, ainda, que espermatozoides ligados ao ácido hialurônico têm 4 a 5 vezes menos probabilidade de apresentarem anomalias cromossômicas (dissomias).

O ácido hialurónico tem a capacidade de excluir células espermáticas imaturas, com extrusão citoplasmática, histonas persistentes e quebra do ADN (Huszar, Hyaluronic acid binding ability of human sperm reflects cellular maturity and fertilizing potential: selection of sperm for intracytoplasmic sperm injection, 2006).

Um estudo feito no Irão afirma existir uma correlação inversa significativa entre a percentagem de ligação ao ácido hialurónico e a deficiência em protaminas e ainda, com a fragmentação de ADN e morfologia espermática anormal (M, Razavi, Vahdati, Fathi, & Tavalae, 2008).

1.6 – Consumo de álcool em Portugal

Portugal, país situado entre os países-membros da União Europeia apresenta um dos maiores consumos de bebidas alcoólicas e de prevalência de problemas ligados ao álcool (Mello, 2001). Segundo dados fornecidos pela Organização Mundial da Saúde, de 2000 a 2005, o continente europeu continua a liderar o consumo mundial de álcool, com uma média anual de 12,4 litros por habitante. Em Portugal, a média é de 13,4 litros.

A ingestão não moderada de álcool acarreta graves consequências, nomeadamente ao nível da qualidade espermática. Mesmo que jovens adolescentes não tenham grandes preocupações na diminuição do seu potencial reprodutor, no futuro, estes jovens adultos poderão ter dificuldade em conceber e perpetuar a sua linhagem.

“Os jovens bebem demasiadas bebidas alcoólicas, e uma percentagem significativa já é dependente do álcool”, revela o estudo “Hábitos alcoólicos durante os festejos da Queima das Fitas” realizado pela Dra. Rosa Costa (2008), em Coimbra. A investigadora acrescenta que o consumo nocivo/abuso destas substâncias foram mais frequentes no sexo masculino e entre os 18 e os 29 anos.

O aumento do consumo de álcool, tabaco, droga e mudanças na alimentação e nos ciclos do sono, durante as semanas académicas, particularmente na comunidade estudantil, estão associados ao decréscimo da qualidade do esperma, no que diz respeito à concentração, mobilidade, morfologia e maturação espermática (Fardilha, 2012).

1.6.1 - Efeito do consumo de álcool e drogas na espermatogénese

A influência do consumo de álcool e drogas na função reprodutora permanece pouco clara e difícil de estudar, de forma cientificamente válida. Contudo, diversos trabalhos apontam para um possível efeito supressor na espermatogénese.

Diversos estilos de vida e muitos factores meio-ambientais apresentam impactos adversos sobre a saúde humana, em particular, na performance reprodutiva (Conrado Avendano, January 2012). Estudos nesta área revelam um efeito negativo de inúmeros agentes sobre o processo de formação das células sexuais masculinas. Entre estes factores encontramos, o álcool, tabaco, drogas de abuso, compostos com alto teor oxidante, stress, uso aumentado de rede wi-fi, entre muitos outros (Conrado Avendano, January 2012). O epitélio seminífero é sensível a factores tais como, temperaturas elevadas, deficiências alimentares, medicamentos, metais (cádmio e chumbo), álcool, entre outros; podendo estes agentes provocar efeitos temporários ou permanentes tais como a degeneração de células germinais e diminuição de células de Sertoli, afectando a produção de espermatozóides (Johnson , Blancahrd , Varner , & Scrutchfield , 1997).

Os efeitos adversos mais significativos do tabaco, sobre as células espermáticas, são a diminuição da concentração e morfologia, assim como, o aumento da taxa de aneuploidia e perda da integridade do ADN. A estes efeitos pode associar-se o aumento da incidência de mutações (Tournaye & Cohlen, 2012).

Em 2000, uma meta-análise, realizada por (Swan et al.,) confirmou uma tendência para a queda da qualidade seminal. Durante o período de estudo, há uma forte evidência para um aumento mundial na incidência de cancro testicular em células germinativas, doença ligada a qualidade do sémen diminuída (Niels Jorgensen et al., 2012).

Os Radicais Livres são um dos factores que causam danos oxidativos celulares e moleculares sobre os lípidos, proteínas e ácidos nucleicos. Radicais livres reagem com ácidos gordos polinsaturados que constituem a membrana celular, promovendo um processo designado Peroxidação lipídica. (Conrado Avendano, January 2012). As membranas dos espermatozóides são susceptíveis aos danos oxidativos provocados pelo peróxido de hidrogénio, pelo anião superóxido e pelo radical hidroxilo (Klebanoff e Coombs, 1991; Bell et al., 1992; Chaki e Misro, 2002). Apesar de estar descrito que doses mínimas fisiológicas de ROS são necessárias para a fertilização do espermatozóide (de Lamirande e Gagnon, 1995), a peroxidação lipídica da membrana espermática é considerada o mecanismo chave do dano induzido pelos ROS, conduzindo à infertilidade (Jayalekshmi, 2006).

Os espermatozóides que produzem níveis mais elevados de ROS são espermatozóides imaturos, com retenção de citoplasma proximal, espermatozóides com macrocefalia e leucócitos (Aitken, 1995; Whittington and Ford, 1999; Gil-Guz-man et al., 2001). Uma vez que os espermatozóides se encontram altamente empacotados e em íntimo contacto celular no interior do epidídimo, os ROS produzidos pelos espermatozóides imaturos vão induzir danos nos espermatozóides maduros. Isto vem explicar os elevados níveis de fragmentação do ADN de espermatozóides extraídos do epidídimo quando comparados com espermatozóides extraídos do testículo (Jayalekshmi, 2006).

Partindo do princípio que, do metabolismo do álcool e das drogas derivam radicais hidroxilo e óxido nítrico (Caires, Shima, Avila, & McLean, 2011), e sabendo que estes provocam o aumento dos níveis de ROS, pretende-se avaliar a forma como o consumo destas substâncias tem influência no processo de maturação espermática e nos restantes parâmetros contemplados na análise básica do esperma. Inúmeros estudos indicam que células germinais e somáticas de testículo humano e de roedores são sensíveis à exposição ao etanol (Caires, Shima, Avila, & McLean, 2011). Em homens alcoólicos, os níveis de testosterona no soro diminuem com o consumo abusivo de álcool, devido ao aumento do stress oxidativo que pode danificar as células de Leydig e de Sertoli, para além do efeito prejudicial sobre eixo HPG (Maneesh, Dutta, Chakrabarti, & Vasudevan, 2006).

A OMS define “infertilidade” como a incapacidade de um casal conceber após o período de um ano de relações sexuais desprotegidas e regulares. Estima-se que a infertilidade conjugal atinja, na população mundial, cerca de 10 a 15% dos casais em idade fértil, metade dos casos associados ao factor masculino. Contudo, e apesar do aumento do conhecimento no que diz respeito à infertilidade masculina, as razões para este problema continuam em muitos casos não diagnosticadas, condição nomeada “infertilidade idiopática” (WHO, 2010).

1.7 – Objectivos

O presente estudo científico, realizado por investigadores da Universidade de Aveiro (UA) em parceria com a Ferticentro (clínica de medicina da reprodução), pretendeu analisar o impacto do álcool e drogas de abuso na qualidade espermática durante a Queima das fitas, uma época de consumos mais exagerados.

Capítulo 2 – Materiais e Métodos

2– Materiais e Métodos

2.1 – Materiais e reagentes

Os kits de HBA® Sperm-Hyaluronan Binding Assay (teste de ligação dos espermatozóides ao ácido hialurónico) foram obtidos à Biocoat (Witmer Road, Horsham, USA).

Todos os reagentes e compostos químicos utilizados são provenientes de PROLABO, distribuído por VWR, e tinham o grau de pureza mais elevado, comercialmente disponível, e foram usados tal como foram recebidos.

2.2 – Material biológico

O presente estudo foi realizado em amostras seminais humanas, provenientes de 31 voluntários com idades compreendidas entre 18 e 28 anos, exceptuando um caso de 39, e pertencendo a maioria dos voluntários à comunidade académica da Universidade de Coimbra (UC). Em todos os casos as amostras seminais foram obtidas por masturbação, após um período de abstinência sexual impreciso, e foram tratadas de acordo com as normas estipuladas pela Organização Mundial da Saúde.

Os parâmetros seminais (concentração, mobilidade e morfologia) dos 31 indivíduos foram avaliados segundo as normas da OMS (WHO, 2010). A concentração espermática foi examinada na câmara de Neubauer (Figura 7) e a mobilidade de cada amostra foi classificada segundo as três categorias estipuladas (OMS, 2010): Mobilidade Progressiva, Mobilidade *in situ* e Imobilidade. A mobilidade Progressiva Rápida é definida por $\geq 25\mu\text{m/s}$ e Lenta $5-24\mu\text{m/s}$, respectivamente. A Mobilidade *in*

situ é caracterizada por não apresentar progressividade e por último, a categoria Imóveis que define a imobilidade dos espermatozóides (WHO, 2010). A morfologia espermática, por sua vez, foi estudada com base no estrito critério de Tygerberg (Kruger et al., 1986).

A maturação espermática foi avaliada utilizando lamelas HBA® constituídas por duas câmaras de teste idênticas revestidas com ácido hialurónico.

2.3 – Desenho experimental

Sendo um estudo científico anónimo, atribuiu-se um código a cada voluntário aquando da entrega da respectiva amostra, e requereu-se-lhes o preenchimento de um questionário (Anexo I) de modo a controlar variáveis externas que possam ter influência sobre os parâmetros avaliados. O estudo consistiu em duas recolhas de esperma, uma primeira, antes da Queima das fitas, e uma segunda recolha, na semana seguinte a este evento académico.

A entrega e o transporte das amostras para o laboratório foram feitos no mínimo intervalo de tempo possível de modo a limitar o efeito das alterações da temperatura e pH sobre as mesmas.

A técnica de amostragem básica para este estudo foi o espermograma (Anexo II), exame básico de análise ao esperma que avalia, conjuntamente, as características dos espermatozóides e os parâmetros físicos do fluido seminal.

A análise das amostras fez-se por procedimentos devidamente padronizados, de modo aos resultados fornecerem informações clínicas úteis. A Organização Mundial da Saúde estipulou um padrão de valores para os parâmetros espermáticos – Valores de

referência da OMS (2010) - de modo a categorizar as amostras de acordo com as características que apresentam.

Tabela I – Valores de referência para o espermograma. Os seguintes parâmetros representam o 5.º percentil aceite (limites de referência e intervalos de confiança a 95%) (WHO, 2010).

♦ Volume
1.5 mL (1.4 – 1.7)
♦ Concentração de espermatozóides
15×10^6 ($12 - 16 \times 10^6$) espermatozóides/mL
♦ Número total de espermatozóides
39×10^6 ($33 - 46 \times 10^6$) espermatozóides/ejaculado
♦ Morfologia
4 % (3 - 4) formas normais
♦ Vitalidade
58 % (55 - 63) vivos
♦ Motilidade Progressiva (PR)
32 % (31 - 34)
♦ Total (PR + NP)
40 % (38 - 42) (progressiva + não progressiva)

2.4 – Avaliação da mobilidade espermática

A motilidade é um dos principais parâmetros espermáticos a ser avaliado, logo após a liquefação das amostras, na medida em que é largamente influenciado, ao longo do tempo, por factores, tais como, oscilação da temperatura e do pH. A contagem dos espermatozóides deve ser rápida de modo a evitar a superestimação da categoria Mobilidade Progressiva (WHO, 2010).

Procedimento:

1. De modo a determinar a mobilidade espermática analisou-se, ao microscópio óptico e com uma ampliação de 200X, uma gota de 10 µL de amostra de sémen não diluída.
2. Foram contabilizados 200 espermatozóides intactos (constituídos por cabeça, peça intermédia e cauda) em cada amostra, e categorizados nas três classes estipuladas pela OMS (2010) - Mobilidade progressiva, Mobilidade *in situ* ou Imobilidade, alterando campos de frequência de modo a evitar a contagem repetida de espermatozóides.
3. Avaliou-se também a presença de aglutinados, pseudo-aglutinados e agregados. A presença de aglutinados não é uma evidência suficiente para deduzir uma causa imunológica da infertilidade, mas é sugestivo da presença de anticorpos anti espermatozóides (WHO, 2010).
4. Ainda, nesta fase da análise, avaliou-se qual a diluição necessária da amostra para a avaliação exacta da concentração espermática, exigida pela câmara de Neubauer, câmara de contagem de células usada neste estudo.

Para que uma amostra seja considerada normal –Normozoospermica- relativamente a este parâmetro, tem que apresentar mínimo 32% de espermatozóides com Mobilidade Progressiva (Rápida + Lenta). Caso a percentagem seja inferior ao valor estipulado pela OMS, a amostra é classificada Astenozoospermica (OMS, 2010).

2.5 – Avaliação da concentração espermática

Para a avaliação da concentração espermática é necessário determinar, previamente, qual a diluição com Formaldeído (para imobilização dos espermatozóides) requerida para cada amostra. Para tal, e numa lâmina, faz-se a contagem dos espermatozóides presentes num campo óptico, com ampliação de 200 ou 400X e, mediante o número de células espermáticas contadas, faz-se a diluição com Formalina a 4%. A proporção de sémen e Formalina está estipulada pela OMS (OMS, 2010).

Na determinação deste parâmetro utilizou-se uma câmara de Neubauer (Figura 7), lâmina grossa de vidro, de formato rectangular e com uma depressão no centro onde é colocada a amostra com o objectivo de contar as células por unidade de volume.

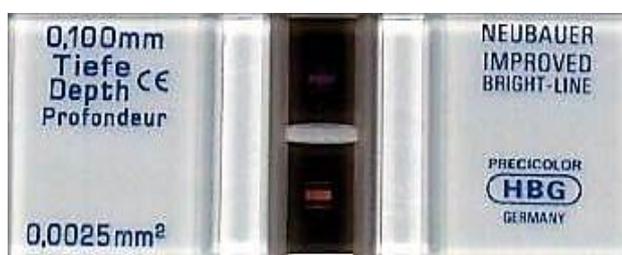


Figura 7 – Câmara de Neubauer, usada na determinação da concentração espermática (adaptado de www.equipolab.com.br).

Procedimento

1. Uma vez determinada a diluição correcta para cada amostra seminal, diluiu-se a mesma com o volume correspondente de Formaldeído 4%, passou-se por vórtex (10 segundos), para homogeneização, e preencheu-se as duas câmaras da Neubauer, em câmara húmida, como assinalado pela OMS.
2. Carregadas as câmaras de contagem da Neubauer, esperou-se 10 a 15 minutos, para que a evaporação da água ajusta-se a distribuição e o posicionamento dos espermatozóides ao longo do compartimento.
3. Contaram-se, pelo menos, 200 espermatozóides por câmara de contagem e contabilizou-se o número de linhas usadas para atingir esse número de células.
4. Compararam-se as contagens repetidas para ver se os valores obtidos são próximos ou se apresentam um intervalo de confiança muito desfasado.
5. Sempre que o somatório dos espermatozóides das duas câmaras de contagem estivesse dentro dos valores limite, estipulados pela OMS, procedia-se ao cálculo da concentração espermática, uma vez que, assim, as alíquotas eram representativas da amostra. Caso contrário, ter-se-ia de avaliar, novamente, qual a diluição correcta da amostra.

Para o cálculo da concentração espermática aplicou-se a fórmula (Figura 8):

$$C = (N/n) * 1/v * \text{Factor de diluição}$$

Figura 8 – Fórmula para o cálculo da concentração espermática

C– Concentração espermática (Milhões de Spz/mL); N– N° total de espermatozóides nas duas câmaras; n- N° total de filas nas duas câmaras; v- volume de amostra.

Para que a amostra seja considerada normal, segundo dados da OMS em 2010, tem que apresentar, pelo menos, 15×10^6 espermatozóides/mL. Caso o valor seja inferior a este, a amostra é classificada astenozoospermica.

2.6 – Avaliação da morfologia espermática

A morfologia dos espermatozóides foi estudada aplicando a técnica colorimétrica Diff-Quik® (DADE Behring, Newark, NJ) e avaliada pelo método estrito de Tygerberg (originalmente descrito por Kruger *et al.*, 1986). Os espermatozóides morfológicamente normais e anormais foram registados, bem como o tipo de anomalia e a região da célula onde se encontra.

Procedimento

1. Preparou-se um esfregaço de sémen fresco, sem diluir, sobre uma lâmina e deixou-se secar à temperatura ambiente, durante 10 minutos, sensivelmente.
2. Passar a lâmina, sucessivamente, e durante 10 segundos, na seguinte sequência: Metanol (fixa os espermatozóides), Eosina (corante ácido alaranjado que cora as proteínas dos espermatozóides) e Nigrosina (melhora a visualização das células pelo background preto).
3. Deixar secar a lâmina durante outros 10 minutos, sensivelmente.
4. Visualizar ao microscópio óptico, com uma ampliação de 1000X, e com auxílio de óleo de imersão.
5. Contabilizar, pelo menos, 200 espermatozóides e registar as anomalias de cabeça, peça intermédia e cauda.

6. Calcular o Índice de Teratozoospermia (ITZ) (Menkveld et al, 2001), através da fórmula (Figura 9).
7. Ainda, registrar a presença de células que não espermatozóides, notando a sua concentração, caso estas sejam abundantes na preparação (Figura 10).

$$\text{IT} = \frac{\text{Anormalidades cabeça + peça intermédia + cauda}}{\text{Nº Espermatozóides anormais}}$$

Figura 9 – Fórmula para o cálculo do Índice de Teratozoospermia ITZ, (Menkveld et al, 2001).

O número total de espermatozóides morfológicamente normais no ejaculado é de importância biológica. Para que uma amostra seja morfológicamente normal, tem que apresentar mínimo 4% de espermatozóides normais. Caso a percentagem seja inferior a 4%, a amostra é Teratozoospermica (OMS, 2010).

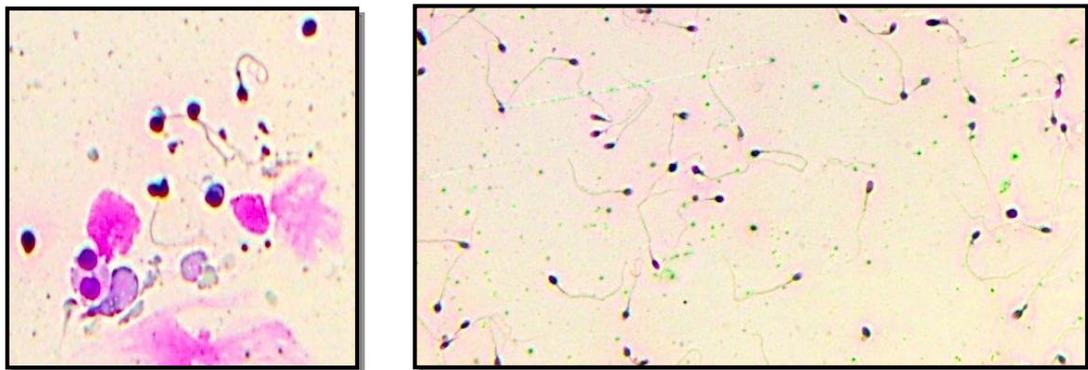


Figura 10 – Imagens obtidas ao microscópio de fluorescência, com ampliação de 200X. À esquerda, células não espermáticas no ejaculado, e à direita, células espermáticas, com aplicação do método Diff-Quik®.

2.7 – Avaliação da maturação espermática

A lamela HBA® tem duas câmaras de teste idênticas revestidas com ácido hialurônico. Contando o número de espermatozóides dotados de mobilidade ligados e não ligados numa área comum, a proporção de espermatozóides passíveis de ligação pode ser calculada.

Procedimento

1. Pipetar uma gota com 7-10 µL de sémen fresco, não diluído, no centro da câmara de teste. Colocar imediatamente a tampa da lamela, evitando bolhas de ar. A tampa da lamela apresenta uma grelha de 100 quadrados, dentro de um círculo de visualização. Colocar a tampa com o círculo para cima.
2. Incubar a lâmina durante 10 a 20 minutos.
3. Contabilizar, no mesmo número de quadrados da grelha, os espermatozóides não ligados dotados de motilidade e os espermatozóides ligados dotados de motilidade
4. A boa precisão do teste é alcançada quando a soma de espermatozóides dotados de motilidade ligados e não ligados equivale a 100-200. Nem sempre é possível encontrar 100 espermatozóides dotados de motilidade numa amostra de sémen, particularmente em amostras oligospérmicas.
5. Calcular a percentagem de espermatozóides passíveis de ligação ao ácido hialurônico, através da fórmula (Figura 11):

$$\% \text{ ligados} = 100X \frac{\text{Espermatozóides dotados de motilidade ligados}}{\text{Espermatozóides dotados de motilidade ligados} + \text{Espermatozóides dotados de motilidade não ligados}}$$

Figura 11 – Fórmula para o cálculo da maturação espermática (Kit HBA®).

2.8 – Análise estatística

Os consumos de álcool, drogas e tabaco dos indivíduos amostrados neste estudo foram aferidos através de um inquérito preenchido antes das duas recolhas. Uma vez que estes consumos não foram inquiridos de forma quantitativa, após uma análise das respostas dadas pelos indivíduos estabeleceram-se categorias de consumo para os três factores. Álcool: 0 - sem consumo; 1- consumo moderado sem preferência por bebidas brancas; 2- consumo moderado com preferência por bebidas brancas e 3 – consumo exagerado. Tabaco: 0 – sem consumo; 1 – 1 a 5 cigarros; 2 – 5 a 10 cigarros; 3 – 10 a 15 cigarros e 4 mais de 20 cigarros. Drogas: 0 – sem consumo; 1 – 1 a 5 charros de haxixe; 2 – 5 a 10 charros de haxixe; 3 – 10 a 15 charros de haxixe e 4 mais de 20 charros de haxixe. Para os diferentes factores analisou-se as frequências das várias categorias antes e depois da Queima das Fitas 2012. As diferenças nos consumos de álcool, tabaco e drogas pelos indivíduos foram obtidas através de um modelo linear generalizado (*Generalized Linear Model*), com os factores álcool, tabaco e drogas como variáveis dependentes, com uma distribuição multinomial e link function: Cummulative logit.

Calculou-se a estatística descritiva para as variáveis em estudo (Concentração, Motilidade, Volume seminal, Morfologia normal e Maturação espermática). Apresenta-se a média e o erro padrão da média para cada variável medida antes e depois da Queima das Fita 2012.

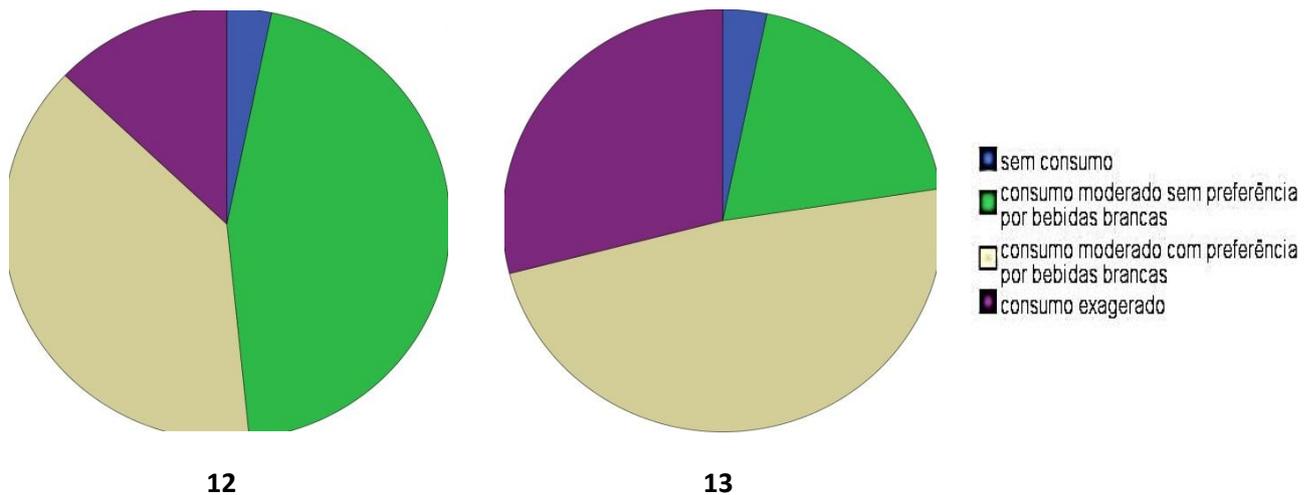
As diferenças entre amostragens feitas antes e depois da queima das fitas foram recolhidas (variáveis emparelhadas) e obtiveram-se através do teste *t* para duas amostras emparelhadas. Além disso, avaliou-se diferenças entre fumadores através de uma A NOVA de duas vias seguida pelo método de Bonferroni para comparações múltiplas. As análises estatísticas foram feitas usando o programa SPSS versão 20® (SPSS Inc, IBM).

Capítulo 3 - Resultados

3.1 - Avaliação da alteração dos hábitos de consumo durante a queima das fitas

3.1.1 - Alteração no consumo de álcool:

De forma a avaliar o consumo de álcool, antes e durante a queima das fitas, estabeleceram-se 4 categorias, como ilustradas nas figuras 12 e 13, respectivamente.

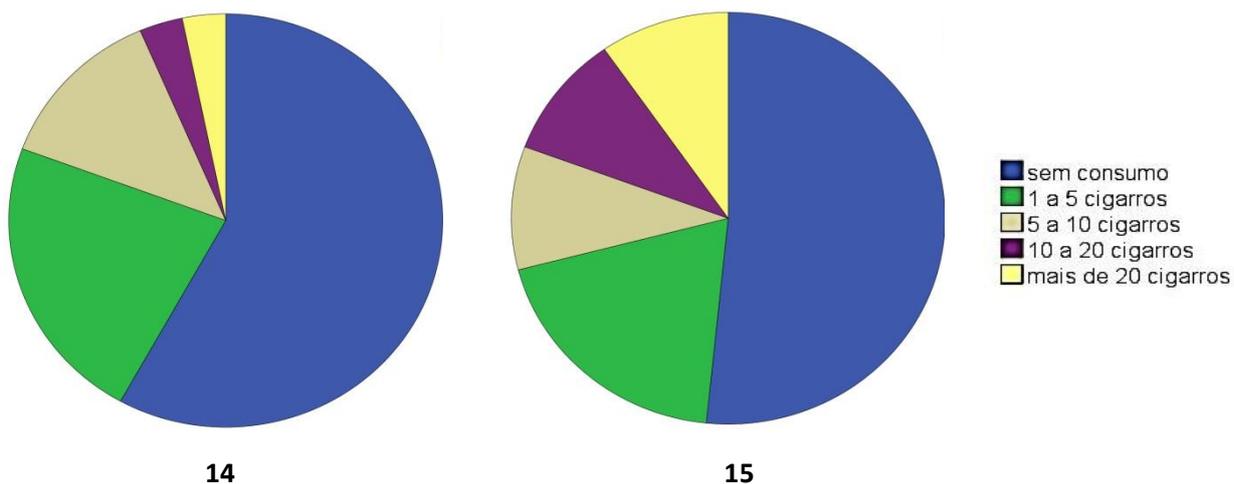


Figuras 12 e 13 – Determinação da variação das frequências no consumo de álcool antes (12) e durante (13) a queima das fitas (n=31).

Analisando as figuras 12 e 13 é notável um aumento evidenciado das categorias **consumo moderado sem preferências por bebidas brancas** e **consumo exagerado** de álcool, no decorrer da queima das fitas. Todavia, os voluntários que não tinham por hábito consumir bebidas alcoólicas mantiveram o seu comportamento.

3.1.2 - Alteração no consumo de tabaco:

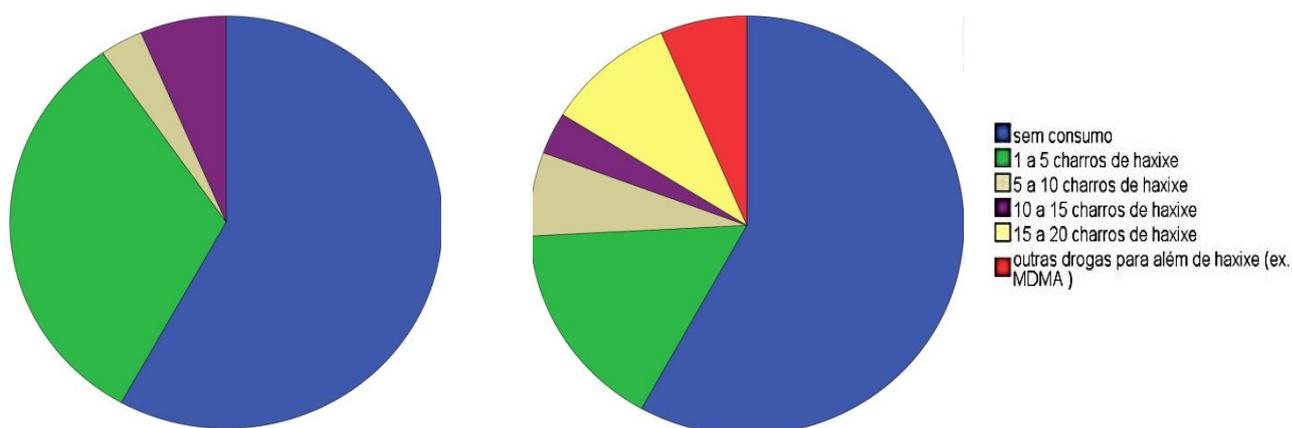
Para avaliar o consumo de tabaco estabeleceram-se cinco categorias e distribuíram-se os trinta e um voluntários do estudo pelas mesmas. (Figuras 14 e 15).



Figuras 14 e 15 – Determinação da variação das frequências no consumo de tabaco antes (14) e durante (15) a queima das fitas (n=31).

Comparando as figuras para o consumo de tabaco antes (14) e durante (15) a queima das fitas é apreciável o aumento das categorias **10 a 20 cigarros** e **mais de 20 cigarros/diários** e a diminuição da categoria **sem consumo**.

3.1.3 - Alteração no consumo de drogas:



Figuras 16 e 17 – Determinação da variação das frequências no consumo de drogas antes (16) e durante (17) a queima das fitas (n=31).

Pela análise das figuras, é perceptível um aumento global do consumo de drogas durante a queima das fitas, para além do aparecimento de duas novas categorias – **15 a 20 charros de haxixe/dia** e **outras drogas para além de haxixe (ex. NMDA)**.

3.2 – Influência do consumo de álcool, drogas e tabaco na concentração espermática

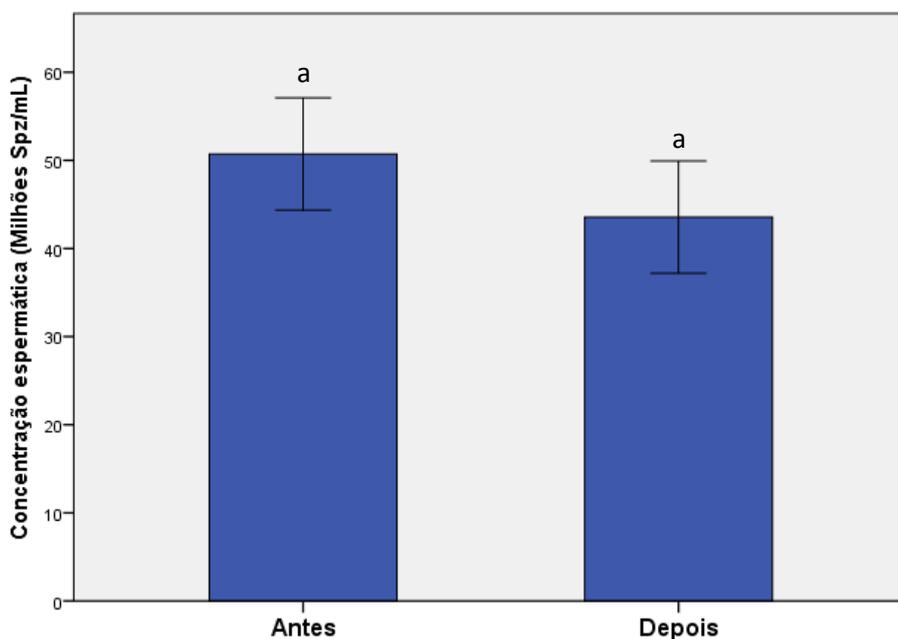


Figura 18 – Concentração média espermática (milhões Spz/mL) avaliada antes e depois da queima das fitas. Os resultados representam a média \pm erro padrão para as duas recolhas (n=31). Letras iguais (a) revela que os valores não são estatisticamente significativos entre si ($p > 0,05$).

Não é possível demonstrar que existem diferenças estatisticamente significativas ($p=0,257$; $t=2,660$; $df=30$) na concentração espermática média entre as amostras analisadas (Figura 18). A média da concentração espermática antes da queima das fitas é $50,72 \pm 6,37$, enquanto a média depois da queima é $43,56 \pm 6,36$ (Tabela II).

3.3 – Influência do consumo de álcool, drogas e tabaco na mobilidade progressiva espermática

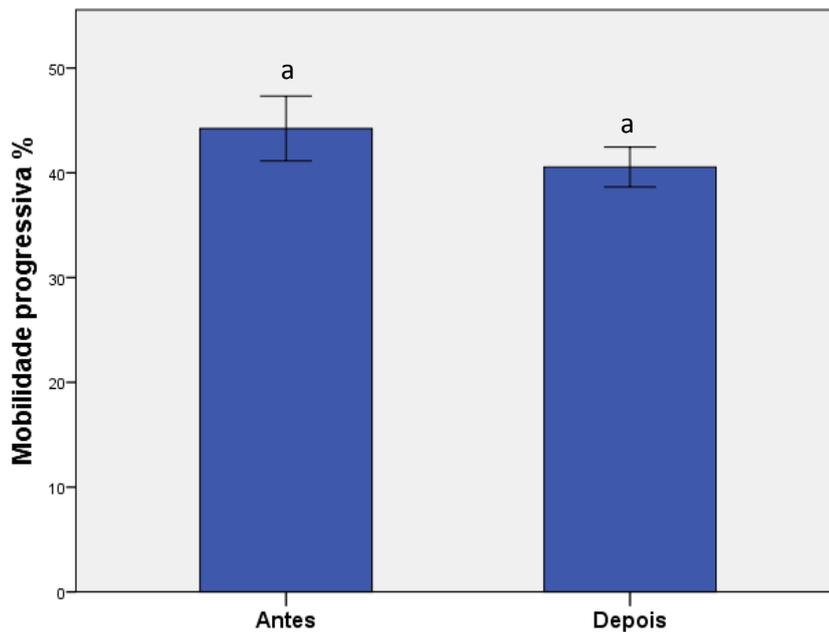


Figura 19 – Percentagem da mobilidade progressiva espermática média avaliada antes e depois da queima das fitas. Os resultados representam a média \pm erro padrão para as duas recolhas ($n=31$). Letras iguais (a) revela que os valores não são estatisticamente significativos entre si ($p>0,05$).

Os resultados obtidos para a mobilidade progressiva espermática antes e depois da queima (Figura 19) não mostraram alterações estatísticas significativas ($p=0,137$; $t=1,526$; $df=30$). A percentagem média de espermatozóides móveis progressivos, antes da queima, é $44\pm 3,1\%$, e depois da queima, $40\pm 1,9\%$.

3.4 - Influência do consumo de álcool, drogas e tabaco no volume seminal

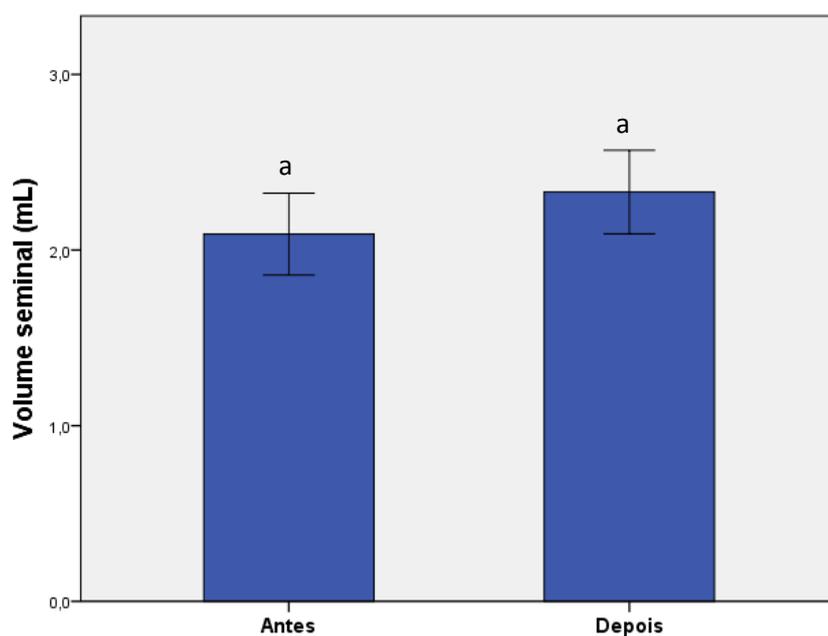


Figura 20 – Determinação da alteração do volume seminal (ml) antes e depois da Queima das Fitas. Os resultados representam a média \pm erro padrão para as duas recolhas (n=31). Letras iguais (a) revela que os valores não são estatisticamente significativos entre si ($p>0,05$).

Os valores da média \pm erro-padrão para o volume seminal, antes e depois da queima das fitas, foram, respectivamente $2,1\pm 0,2$ e $2,3\pm 0,2$. Através da análise estatística obteve-se um ($p=0,124$; $t=-1,814$; $df=30$) o que indica que os valores não são estatisticamente significativos entre si.

3.5 - Influência do consumo de álcool, drogas e tabaco na maturação espermática

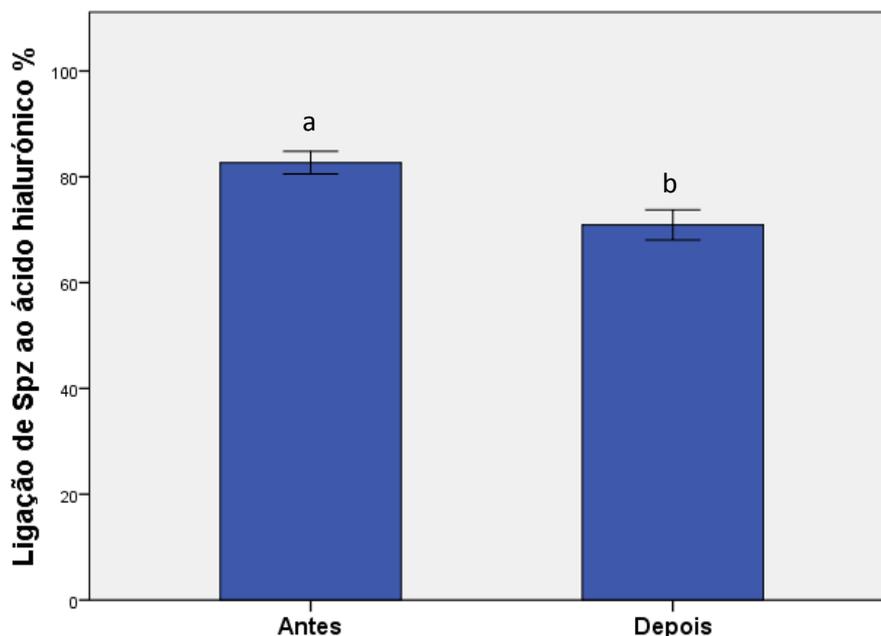


Figura 21 – Percentagem média de espermatozoides ligados ao ácido hialurônico, avaliado pelo kit HBA®. Os resultados representam a média±erro-padrão em percentagem de 200 espermatozoides observados em cada amostra (n=31), antes e depois da queima. Letras diferentes (a e b) revelam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

A avaliação estatística deste parâmetro apresentou um $p=0,01$ ($t=-4,861$; $df=31$) (Tabela III), o que revela diferenças estatisticamente significativas entre as duas recolhas. A média±erro-padrão antes e depois da queima é, respectivamente, $82,7 \pm 2,1$ % e $70,9 \pm 2,8$ % (Tabela I). Da análise estatística feita até ao momento, este é o primeiro parâmetro seminal com diferenças estatisticamente significativas entre as duas amostragens ($p < 0,05$).

3.6 - Influência do consumo de álcool, drogas e tabaco na morfologia espermática

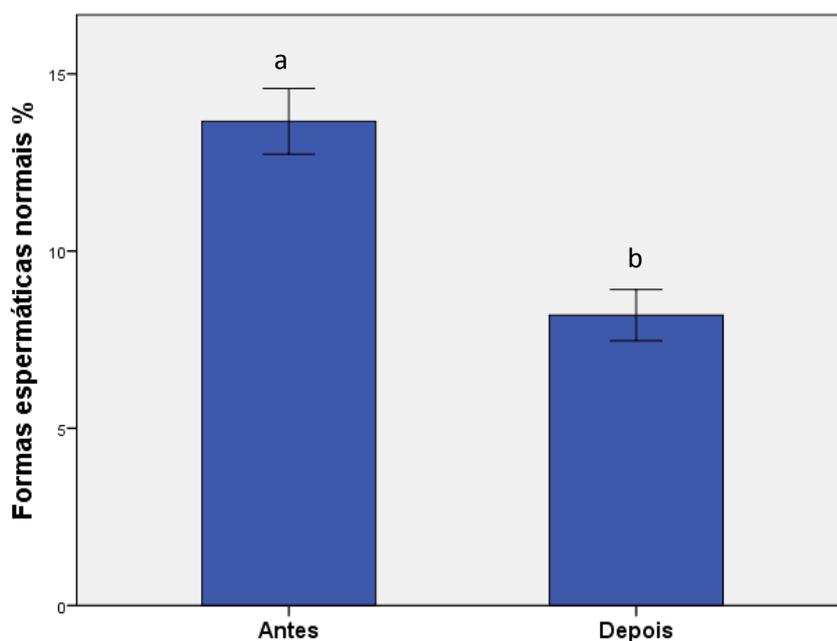


Figura 22 – Percentagem média de espermatozoides com formas normais. Os resultados representam a média±erro-padrão em percentagem da morfologia de 200 espermatozoides em cada amostra (n=31), antes e depois da queima. Letras diferentes (a e b) revelam diferenças estatisticamente significativas com $p < 0,05$ entre os dois períodos de recolha.

Relativamente à influência do álcool, drogas e tabaco sobre a morfologia espermática, obtiveram-se diferenças estatisticamente significativas com $p=0,000$ ($t=6,132$; $df=30$) - (Tabela III). Antes da queima das fitas, os valores da média±erro-padrão foi $13,6 \pm 0,9$ % e os valores obtidos para depois da queima das fitas foi $8,2 \pm 0,7$ % (Tabela II). Pela análise da Figura 22 é perceptível uma redução acentuada na percentagem de espermatozoides normais depois da queima das fitas.

Tabela II – Estudo da alteração das variáveis espermáticas - volume seminal, concentração, mobilidade progressiva, espermatozóides normais, índice de teratozoospermia e ligação ao ácido hialurónico – antes e depois da queima das fitas (n=31).

	Antes	Depois
Volume seminal (mL)	2,1 ± 0,233 (31) ^a 0,2 – 6,2	2,3±0,238 (31) ^a 0,2 – 6,0
Concentração espermática (milhões Spz/mL)	50,72 ± 6,375 (31) ^a 3 – 175	43,56 ± 6,365 (31) ^a 2 - 155
% Mobilidade Progressiva espermática	44 ± 3,086 % (31) ^a 1 – 75%	41 ± 1,909 % (31) ^a 14 – 69 %
% Formas normais	14± 0,928 % (31) ^b 4 -25 %	8 ± 0,724 % (31) ^a 1 -18 %
ITZ	1,42±0,032 (31) ^a 1,11 – 1,78	1,45± 0,022(31) ^a 1,22 – 1,78
%Ligação ao Ácido hialurónico	83±2,142 % (31) ^b 55 -99%	71±0,028 % (31) ^a 29 – 95%

Nota: Os valores para as várias variáveis medidas antes e depois da queima das fitas são apresentados como média±erro padrão da média, seguido do tamanho da amostra em parêntesis. Letras diferentes revelam diferenças estatisticamente significativas com $P < 0,05$ entre os dois períodos de recolha.

Tabela III - Resultados do teste t para amostras emparelhadas das várias variáveis espermáticas, realizado entre as duas recolhas (n=31).

Teste T amostras emparelhadas			
	t	df	p
Volume seminal	-1,814	30	0,124
Concentração espermática	2,660	30	0,257
Mobilidade espermática	1,526	30	0,137
Formas normais	6,132	30	< 0,001
ITZ	-1,453	30	0,157
Ligação ao ácido Hialurónico	-4,861	30	p < 0,001

3.7- Avaliação de parâmetros espermáticos em fumadores e não fumadores.

3.7.1 – Concentração espermática em fumadores e não-fumadores

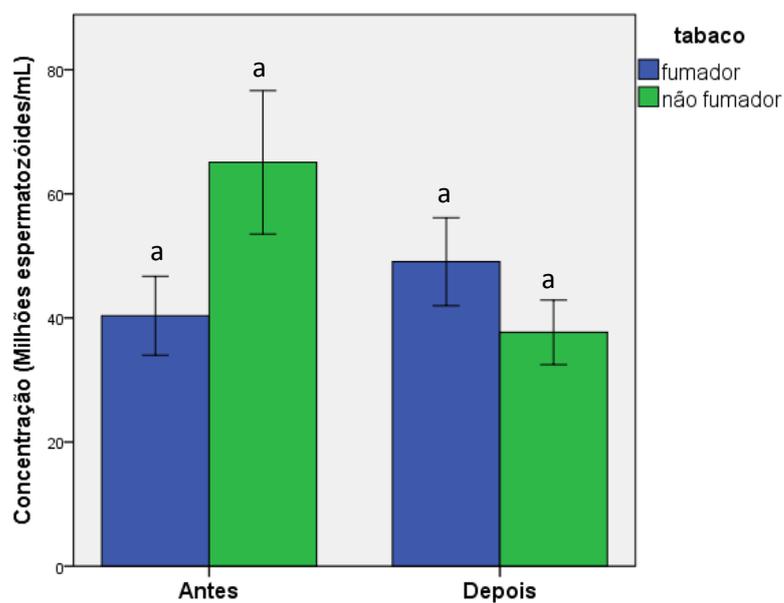


Figura 23 – Concentração espermática média (milhões Spz/mL) de fumadores e não-fumadores, antes e depois da queima das fitas. Os resultados representam a média \pm erro padrão para as duas recolhas (n=31). Letras iguais (a) revela que os valores não são estatisticamente significativos entre si ($p>0,05$).

Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas ($p>0,05$) para a concentração espermática, entre fumadores e não-fumadores, antes e depois da queima das fitas.

3.7.2 – Mobilidade progressiva espermática em fumadores e não-fumadores

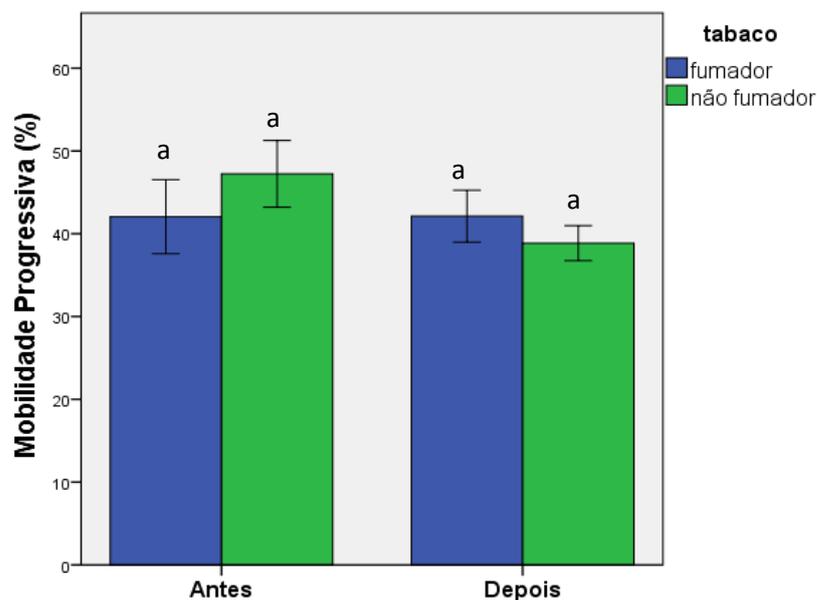


Figura 24 – Mobilidade progressiva espermática média (%) avaliada antes e depois da queima das fitas. Os resultados representam a média \pm erro padrão para as duas recolhas (n=31). Letras iguais (a) revela que os valores não são estatisticamente significativos entre si ($p>0,05$).

Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas ($p>0,05$) para a mobilidade progressiva espermática, entre fumadores e não-fumadores, antes e depois da queima das fitas.

3.7.3 – Morfologia espermática normal em fumadores e não-fumadores

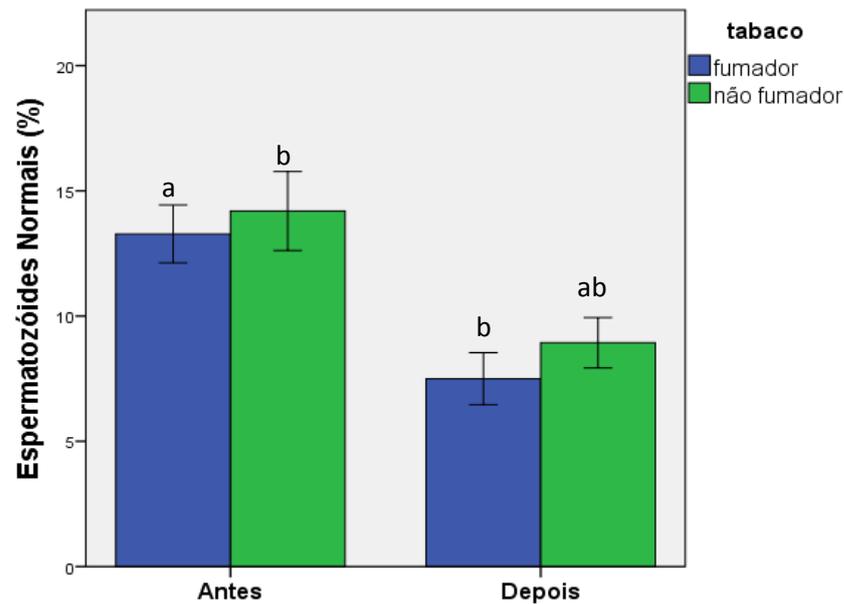


Figura 25 – Média de espermatozoides com formas normais (%). Os resultados representam a média±erro-padrão (n=31), antes e depois da queima. Letras diferentes revelam diferenças estatisticamente significativas com $p < 0,05$ entre os dois períodos de recolha.

No que respeita à morfologia espermática foram encontradas diferenças estatisticamente significativas, representadas por letras diferentes, conforme apresentado na figura 25.

3.7.4 – Ligação ao ácido hialurónico em fumadores e não-fumadores

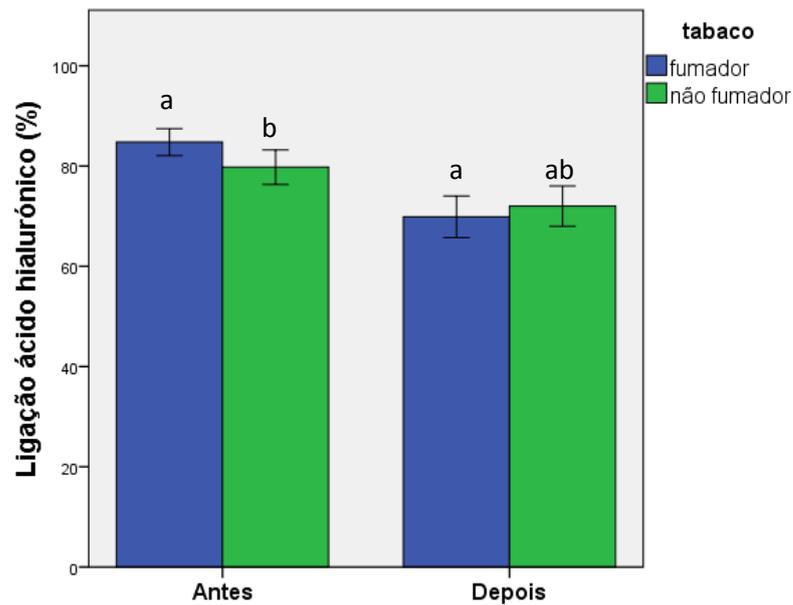


Figura 26 – Média de espermatozoides ligados ao ácido hialurónico (%). Os resultados representam a média±erro-padrão em cada amostra (n=31), antes e depois da queima. Letras diferentes revelam diferenças estatisticamente significativas (p <0,05).

O gráfico acima apresentado revela diferenças estatisticamente significativas entre diferentes amostragens, indicadas com letras diferentes (Figura 26).

Capítulo 4 - Discussão

4 – Discussão

No presente estudo foi avaliada a qualidade espermática, no que respeita a concentração, mobilidade progressiva, maturação, morfologia e volume seminal, antes e depois de uma época propícia para o consumo desmedido de álcool, drogas e tabaco. Os resultados obtidos revelaram diferenças estatisticamente significativas apenas em dois dos parâmetros – morfologia e maturação espermática medida através do teste do ácido hialurónico (Tabela I).

A não obtenção de diferenças significativas na totalidade dos parâmetros avaliados, avaliados entre as duas amostragens, deve-se em grande parte à falta de homogeneidade e representatividade da amostra de estudo (n=31). Mesmo analisando diversas variáveis externas tais como, dias de abstinência sexual, número de filhos, índice de massa corporal, estado de saúde, hábitos de consumo de álcool, drogas e tabaco, foi impossível alcançar a homogeneidade da amostra. Para além das variáveis externas já referidas existe uma panóplia de factores que têm influência sobre o processo de espermatogénese, não obstante o epitélio germinativo ser um dos mais sensíveis a alterações biogeoquímicas e ambientais (Wróblewska, Kaminski, & Lakota, 2012).

4.1– Influência do consumo de tabaco sobre os parâmetros espermáticos

O fumo do cigarro apresenta sensivelmente 4000 produtos tóxicos, como a nicotina, monóxido de carbono, agro-tóxicos (ex. DDT), metais pesados (Chumbo e Cádmio), entre outros (Castro, 2010). Estudos feitos com cádmio mostraram correlações negativas entre a concentração deste metal pesado e a motilidade e concentração espermáticas (Pant et al, 2003). Estudos distintos avaliaram também a relação entre a

cotina, principal metabolito da nicotina, no plasma seminal e os parâmetros seminais, mostrando uma correlação inversa entre este metabolito e a concentração, motilidade e morfologia espermática (Wong et al, 2000). Além disso, a exposição pré-natal ao fumo de tabaco também tem sido referenciada pela diminuição da qualidade do sémen, comparativamente a homens não expostos (Storgaard et al, 2003;. Jensenet al., 2005).

Porém, o mecanismo responsável pelo efeito nocivo do fumo de tabaco na qualidade espermática não está integralmente compreendido. Há evidências de perturbação do eixo Hipotálamo-Hipófise-Gonadal (HHG) (Vermeulen, 1993) ou hipoxia leve, causada pela ruptura da microcirculação testicular (Collin et al., 1995), mas o efeito tóxico directo dos componentes químicos do fumo de cigarro sobre o epitélio germinativo é a explicação mais plausível (Zenzes, 2000).

Por outro lado, o zinco é um antioxidante e estimulante da divisão celular que pode ser indicado como tratamento promissor em homens com infertilidade causada pelos componentes tóxicos do fumo do cigarro (Garcia , Piffer, Gerardin, Sankako, De Lima, & Pereira, 2011).

4.2 – Influência do consumo de álcool sobre os parâmetros espermáticos

O álcool pode interferir com a função do sistema reprodutor masculino, constituído por hipotálamo, glândula pituitária anterior e testículos, provocando impotência, infertilidade e redução das características sexuais secundárias. No caso dos testículos, o álcool pode afectar as células de Leydig, secretoras da testosterona, e células de Sertoli, que desempenham um papel importante na maturação espermática. Estudos mostraram que o consumo excessivo de álcool reduz os níveis de testosterona no sangue (Emanuele & Emanuele , 1998). Desta forma, consta que os efeitos nocivos

do álcool sobre a reprodução são mediados a todos os níveis pela unidade reprodutiva masculina: o hipotálamo, a hipófise e os testículos (Eixo Hipotálamo-Hipófise-Gonadal) (Emanuele & Emanuele , 1998).

Por isso, a via biossintética da testosterona, constituída por uma série de precursores esteróides e respectivas enzimas (Hadley 1988), tem sido alvo preferencial de estudo. Contudo, e por diversas razões, não tem sido possível concluir que parte específica da via é afectada pelo álcool (Maneesh, Dutta, Chakrabarti, & Vasudevan, 2006). Uma estratégia para prevenir os efeitos supressivos do álcool, na síntese de testosterona, envolve a administração da própria hormona; outros métodos envolvem o bloqueio da degradação da testosterona através da acção de inibidores da aromatase, enzima chave envolvida na conversão de testosterona em estrogénio, tais como Fadrozol (Emanuele & Emanuele , 1998).

Embora seja sabido que o consumo crónico de álcool produz disfunção sexual e prejudica a produção de esperma em seres humanos e animais (Yen e Jaffe 1991), os mecanismos responsáveis pela indução deste dano não foram completamente esclarecidos (Emanuele & Emanuele , 1998). Estudos mostraram que, quando administrado isoladamente, o etanol reduziu significativamente a densidade e mobilidade espermática, relativamente aos controlos (Dare , Noronha , Kusemiju, & Okanlawon, 2002).

4.3 – Influência do consumo de drogas sobre os parâmetros espermáticos

Estudos feitos em células espermáticas avaliaram o efeito negativo de alcalóides, tais como a Arecolina, sobre a fertilidade masculina, e os resultados mostraram um forte efeito na redução da motilidade progressiva espermática (Juan , et al., 2012). Outro

estudo, com alcalóides quinolizidínicos, mostrou uma diminuição significativa na contagem de espermatozóides, motilidade, viabilidade, morfologia e níveis plasmáticos de testosterona (Olayemi & Raji, 2011).

Inúmeros estudos avaliaram o efeito das drogas na função reprodutora masculina e um grande número aponta para um efeito supressor sobre a qualidade seminal. Uma pesquisa feita administrando HU210 (canabinóide sintético) em ratinhos, mostrou uma redução das células de Sertoli com o tempo de exposição, assim como uma redução acentuada da motilidade (M Lewis, et al., 2012).

Outros estudos apontam, ainda, para um efeito benigno de *Lepidium meyenii*, (comumente designada “Ginseng dos Andes”) na performance reprodutiva masculina. As suas propriedades provocam o aumento da concentração e motilidade espermática (Gonzales, Rubio, Gasco, Nieto, Yucra, & Gonzales, 2005).

Estes resultados apontam para uma necessidade urgente de avaliação do potencial de fertilidade masculino em consumidores habituais de drogas.

4.4 – Estudo das alterações dos parâmetros espermáticos

Neste trabalho verificou-se que existem diferenças estatisticamente significativas apenas em dois parâmetros espermáticos – morfologia e maturação espermática – após a Queima das Fitas. Relativamente à ligação dos espermatozóides ao ácido hialurónico, houve uma diminuição de 11,8% da primeira para a segunda amostragem e, no caso da morfologia, a diminuição de formas normais foi de 5,4%, entre as duas recolhas. Deste modo, é possível concluir que o aumento do consumo de álcool, drogas e tabaco, durante a queima das fitas, afectou negativamente a maturação e a morfologia espermática. Estas conclusões vão ao encontro do postulado por (Prinosilova, et al.,

2009), que afirma existir uma correlação entre a proporção de espermatozóides com morfologia normal (pelo critério de Tygerberg) e sua ligação ao ácido hialurónico. Desta forma, a ligação ao ácido hialurónico reflecte a maturidade espermática e a morfologia normal (Prinosilova, et al., 2009).

Ao contrário dos resultados obtidos para a morfologia e maturação espermáticas, não se obtiveram diferenças estatisticamente significativas no que respeita à concentração, mobilidade espermática e volume seminal.

Os resultados obtidos para o volume seminal fazem sentido na medida em que o volume de ejaculado depende de inúmeros factores, tais como período de abstinência sexual, funcionamento das glândulas anexas – próstata, vesículas seminais e em menor proporção da glândula de Cowper, frequência de actividade sexual, idade, dieta, entre outros factores; e neste estudo, nenhuma destas variáveis foi regularizada.

No que respeita à concentração e mobilidade espermática não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas antes e depois da queima. Analisando também os parâmetros espermáticos de fumadores e não-fumadores, não se encontraram diferenças. Estudos subsequentes têm que ser realizados aumentando o tamanho e a homogeneidade da amostra de estudo através da padronização de variáveis externas como período de abstinência sexual, dieta, idade, entre outros; e aumentando o tempo de exposição aos factores que se pretendem avaliar, neste caso, álcool, drogas e tabaco.

Existem inúmeras pesquisas acerca de compostos, sintéticos ou naturais, com potencial capacidade de aumento da qualidade espermática, entre eles, encontramos o ômega-3, presente nalguns alimentos, reverte para numa maior actividade antioxidante do fluido seminal e aumenta a concentração, motilidade e morfologia dos espermatozóides (Safarinejad & Safarinejad, 2012). O zinco, constituinte e activador de várias enzimas, também desempenha um papel significativo no metabolismo de lipídios,

proteínas e carboidratos, e, juntamente com magnésio estabiliza as membranas celulares (Kabata- Pendias e Pendias, 1999; Kabata-Pendias e Mukherjee, 2007).

Apesar de ser necessário apenas um espermatozóide para fertilizar o óvulo, vários estudos têm demonstrado que a capacidade de fertilização diminui se a concentração espermática for inferior a 40-50 milhões Spz/mL ou se a percentagem de espermatozoides normais for inferior a 9%. Problemas de fertilidade mais graves podem estar presentes quando a concentração de espermatozoides é inferior a 15 milhões Spz/mL e a percentagem de espermatozoides normais for inferior a 5% (Niels Jorgensen et al., 2012).

Capítulo 5 – Conclusões finais

5 – Conclusões finais

A maturação espermática envolve fortes alterações morfológicas e bioquímicas, permitindo que os espermatozóides adquiram motilidade progressiva bem como potencial para sobrevivência e para o sucesso na fertilização.

Conclui-se que apesar de neste trabalho não se terem alcançado os resultados desejados a nível de todos os parâmetros espermáticos, verificou-se contudo que o consumo desmedido de álcool, tabaco e drogas provoca a diminuição na morfologia normal e maturação espermática, parâmetros de extrema importância na reprodução.

A morfologia espermática, por sua vez, foi reconhecida como sendo o melhor preditor para o sucesso da fertilização natural. Este parâmetro é um requisito essencial para que ocorra um normal reconhecimento entre os gâmetas masculino e feminino, aquando da fecundação.

As células que integram a zona pelúcida são altamente selectivas na ligação de espermatozóides morfológicamente normais. Por esta razão, a percentagem de espermatozóides com morfologia normal, e acrossoma intacto, e o número de espermatozóides ligados à ZP foram altamente correlacionadas com as taxas de fertilização *in vitro*. Estes aspectos devem ser tido em conta na análise espermática.

Um ensaio com maior número de amostras biológicas e com um maior tempo de exposição aos factores a analisar será essencial para realçar o efeito do álcool, drogas e tabaco nos parâmetros analisados.

Capítulo 6 – Referências bibliográficas

- Caires, K. C., Shima, C. M., Avila, J. d., & McLean, D. J. (2011). Acute ethanol exposure affects spermatogonial stem cell homeostasis in pre-pubertal mice. *Reproductive Toxicology*, 76.
- Castro, I. d. (2010). *Associação de defesa da saúde do fumante*. Obtido em 30 de Julho de 2012, de www.adesf.org.br/: <http://www.adesf.org.br/>
- Cheng, Y.-H., Wong, E. W., & Cheng, C. (2011). Cancer/testis (CT) antigens, carcinogenesis and spermatogenesis. *Spermatogenesis*, 209.
- Conrado Avendano, M. ^a. (January 2012). Use of laptop computers connected to internet through Wi-Fi decreases human sperm motility and increases sperm DNA fragmentation. *Fertility and Sterility Vol. 97, Nº. 1*, 39.
- Dare, W., Noronha, C., Kusemiju, O., & Okanlawon, O. (2002). The effect of ethanol on spermatogenesis and fertility in male Sprague-Dawley rats pretreated with acetylsalicylic acid. *Niger Postgrad Med*, 194.
- Emanuele, M., & Emanuele, N. (1998). Alcohol's effects on male reproduction. *Alcohol Health Res World*, 195-201.
- Fardilha, M. (2 de Maio de 2012). *Ciência hoje*. Obtido em 27 de Julho de 2012, de www.cienciahoje.pt: <http://www.cienciahoje.pt>
- Fernandez, M. F., Duran, I., Olea, N., Avivar, C., Vierula, M., Toppari, J., et al. (2010). Semen quality and reproductive hormone levels in men from Southern Spain. *International Journal of Andrology*.
- Garcia, P. C., Piffer, R. C., Gerardin, D. C., Sankako, M. K., De Lima, R. A., & Pereira, O. M. (2011). Could zinc prevent reproductive alterations caused by cigarette smoke in male rats? *Reproduction, Fertility and Development*.
- Gonzales, C., Rubio, J., Gasco, M., Nieto, J., Yucra, S., & Gonzales, G. (2005). Effect of short-term and long-term treatments with three ecotypes of *Lepidium meyenii* (MACA) on spermatogenesis in rats. *Journal of Ethnopharmacology*.
- Huszar, G. (2006). Hyaluronic acid binding ability of human sperm reflects cellular maturity and fertilizing potential: selection of sperm for intracytoplasmic sperm injection. *Curr Opin Obstet Gynecol*, 260.
- Huszar, G., Ozenci, C., Cayli, S., Zaczki, Z., Hansch, E., & Vigue, L. (2003). Hyaluronic acid binding by human sperm indicates cellular maturity, viability, and unreacted acrosomal status. *Fertil Steril*, 24.
- Jayalekshmi, M. M. (2006). Role of reactive oxygen species and antioxidants on pathophysiology of male reproduction. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 82.

- Johnson , L., Blancahrd , T., Varner , D., & Scrutchfield , W. (1997). Factors affecting spermatogenesis in the stallion. *Theriogenology*, 216.
- Juan , J., Yang, D., Liang , Y., Gao , W., Ren , Z., Zeng, W., et al. (2012). Alkaloids from areca (betel) nuts and their effects on human sperm motility in vitro. *J Food Sci*.
- Kamischke, A., & Nieschlag, E. (1999). Analysis of medical treatment of male infertility. *Human Reproduction*, 1-23.
- Kovacs, P., Kovats, T., Sajgo, A., Kaali, S. G., & Szollosi, J. (September de 2010). The role of hyaluronic acid binding assay in choosing the fertilization method for patients undergoing IVF for unexplained infertility. *Assisted Reproduction Technologies*, 50.
- Liu , D., & Baker, H. (1992). Tests of human sperm function and fertilization in vitro. *Fertility and sterility* .
- M Lewis , S., Paro , R., Borriello , L., Simon, L., Robinson , L., Dincer , Z., et al. (2012). Long-term use of HU210 adversely affects spermatogenesis in rats by modulating the endocannabinoid system. *International Journal of Andrology*.
- M, N.-E. H., Razavi, S., Vahdati, A. A., Fathi, F., & Tavalae, M. (2008). Evaluation of sperm selection procedure based on hyaluronic acid binding ability on ICSI outcome. *J Assist Reprod Genet* , 197.
- Maneesh, M., Dutta, S., Chakrabarti, A., & Vasudevan, M. (2006). ALCOHOL ABUSE-DURATION DEPENDENT DECREASE IN PLASMA. *Indian J Physiol Pharmacol*, 291-296.
- Mello, M. L. (Novembro de 2001). *Álcool e problemas ligados ao álcool em Portugal*. Obtido em 27 de Julho de 2012, de www.azores.gov.pt: <http://www.azores.gov.pt>
- Mohum, J. (2005). *Human* . Singapura: Dorling Kindersley.
- Niels Jorgensen et al. (2012). Human semen quality in the new millenium: a prospective cross-sectional population-based study of 4867 men. *BMJ open accessible medical research*, 1.
- Nijs, M., Creemers , E., Cox , A., Janssen , M., Vanheusden , E., Van der Elst , J., et al. (2010). Relationship between hyaluronic acid binding assay and outcome in ART: a pilot study. *Andrologia*, 291.
- Olayemi , F., & Raji, Y. (2011). Quinolizidine alkaloids: the bioactive principles in *Cnestis ferruginea* (de Candolle) with male antifertility activities. *Afr J Med Med Sci*.
- Oliva, S., Rinaldo, P., & Stumpp, T. (2009). Epididymal biology: spermatid maturation and gene expression. *O Mundo da Saúde*.
- Prinosilova, P., Kruger , T., Sati , L., Ozkavukcu , S., Vigue , L., Kovanci , E., et al. (2009). Selectivity of hyaluronic acid binding for spermatozoa with normal Tygerberg strict morphology. *Reprod Biomed Online*, 83.

- Safarinejad, M., & Safarinejad, S. (2012). The roles of omega-3 and omega-6 fatty acids in. *Asian Journal of Andrology*, 514-515.
- Simões, R. (31 de Janeiro de 2011). *Biblioteca virtual - Centro de Documentação e Informação da FAPESP*. Obtido em 5 de Julho de 2012, de Web site de bv-cdi fapesp: <http://www.bv.fapesp.br/pt>
- Tournaye, H. J., & Cohlen, B. J. (2012). Management of male-factor infertility. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics and Gynaecology*, 2.
- Vine, M. F., Setzer, W., B, R., Everson, & Wyrobek, A. (1997). HUMAN SPERM MORPHOMETRY AND SMOKING, CAFFEINE, AND ALCOHOL CONSUMPTION. *Reproductive Toxicology*.
- Wróblewska, U. M., Kaminski, P., & Lakota, P. (2012). Influence of Chemical Elements on Mammalian Spermatozoa. *Folia Biologica*, 7-15.
- Ye, H., Huang, G.-n., Gao, Y., & Liu, D. Y. (2006). Relationship between human sperm-hyaluronan binding assay and fertilization rate in conventional in vitro fertilization. *Human Reproduction*, Vol. 21, 1545.

Capítulo 7 - Anexos

Influência dos abusos estudantis durante os festejos académicos nos espermatozóides

Questionário

Nota: Este inquérito é confidencial e destina-se exclusivamente a ser utilizado neste projecto de investigação científica e estudos dele decorrentes. Os dados relativos ao e-mail e contacto telefónico dos participantes serão apenas utilizados para envio dos resultados do espermograma e para prestar informações relacionadas com as fases seguintes do estudo.

Voluntário nº	
E-mail	
Telemóvel (facultativo)	
Data da recolha	
Hora da recolha	
Hora de recepção da amostra:	
Hora de realização do espermograma	
Pretende receber o resultado do espermograma por e-mail? (Sim/Não)	

Dados gerais

Idade:	
Nº de dias de abstinência sexual:	
Doenças relevantes actuais ou passadas (incluir história de tratamentos oncológicos, parotidite com orquite e consumos actuais de medicamentos ou suplementos alimentares):	
Nº de filhos:	

Consumos habituais

Tabaco (nº médio cigarros/dia no último mês)	
Álcool (média diária do último mês) – descrever o tipo de bebidas e quantidades respectivas	
Drogas (média diária do último mês) – descrever o tipo de drogas e quantidades respectivas	
Drogas (história de consumo no passado)	

Anexo I – Questionário preenchido pelos participantes do estudo “Para o frasco” aquando da entrega da amostra de esperma.

Espermograma

Paciente:**Código:****Local de recolha:****Data:****Abstinência:**

Hora da recolha:

Hora da análise:

(3-7 dias)

Características físicas da amostra

Valores de referência (OMS, 2010)

Cor/opacidade: Liquefacção:
 Viscosidade: Aglutinação:
 pH: ($\geq 7,2$)

Concentração de Espermatozóides

Volume	ml	(1,5 - 6ml)
Concentração	$\times 10^6/\text{ml}$	($\geq 15 \times 10^6/\text{ml}$)
Total no ejaculado	$\times 10^6$	($\geq 39 \times 10^6$)

Mobilidade dos Espermatozóides

Móveis progressivos	%	
Móveis não progressivos	%	
Imóveis	%	
Móveis (M)	%	($\geq 40\%$)
Móveis progressivos (MP)	%	($\geq 32\%$)

Vitalidade dos Espermatozóides (a realizar quando a percentagem de espermatozóides móveis é <40%)

Espermatozóides mortos	%	
Espermatozóides vivos	%	$\geq 58\%$

Morfologia

Formas normais:	%	$\geq 4\%$
Formas anormais:	%	
Anomalias da cabeça:	%	
Anomalias do colo ou peça intermédia:	%	
Anomalias da cauda:	%	
Índice de teratozoospermia:		$\geq 1,6$

Outras células

Leucócitos:	%
Células germinativas imaturas:	%

Relatório:

O analista,

Anexo II – Espermograma com valores de referência segundo (OMS, 2010).