



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR
Covilhã | Portugal



FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Efeito do Consumo do Tabaco na Fertilidade Masculina

Álvaro André Vilela de Oliveira

Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Medicina

• Covilhã, Junho de 2010 •



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR
Covilhã | Portugal



FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Efeito do Consumo do Tabaco na Fertilidade Masculina

Álvaro André Vilela de Oliveira

• Covilhã, Junho de 2010 •

Dissertação apresentada à Universidade da Beira Interior para obtenção do grau de
Mestre em Medicina

Título: Efeito do consumo do tabaco na fertilidade masculina

Orientador: Professora Doutora Sílvia Socorro

Co-Orientador: Professor Doutor José Eduardo Cavaco

Resumo

O efeito do fumo do tabaco representa um dos maiores desafios mundiais de saúde, devido à sua alta prevalência a nível mundial e à elevada morbilidade e mortalidade resultantes das suas inúmeras complicações. Uma vez que o número de fumadores está a aumentar em todo o mundo, é importante compreender completamente o impacto na reprodução humana e os riscos associados ao fumo do cigarro. O objectivo desta dissertação de mestrado é realizar uma revisão bibliográfica sistemática sobre o impacto do fumo do cigarro na espermatogénese e, consequentemente, na fertilidade masculina, bem como procurar elucidar os mecanismos patofisiológicos que contribuem para este problema. Vários estudos demonstraram que o fumo do tabaco afecta negativamente a espermatogénese, comprometendo assim a fertilidade masculina. Provoca significativas alterações cromossómicas e no ADN dos espermatozóides, sendo a aneuploidia a alteração mais prevalente. É responsável por provocar também alterações no volume e densidade do esperma, bem como na morfologia e mobilidade dos espermatozóides. O fumo do tabaco é ainda capaz de provocar alterações nos níveis e secreções hormonais, alterando também, consequentemente, a espermatogénese. Pode ainda ser responsável pela alteração da normal constituição do fluido seminal. Com base nas publicações existentes é possível concluir que o fumo do cigarro afecta negativamente a qualidade do esperma, por interferência a vários níveis na espermatogénese, acarretando, por isso, consequências nefastas para a fertilidade masculina. Embora estudos em modelos animais tenham demonstrado que o fumo do cigarro é responsável por alterações na espermatogénese e, consequentemente, na fertilidade, estão ainda por elucidar alguns mecanismos patofisiológicos que conduzem a estas

alterações. Deste modo torna-se necessário realizar estudos que visem detalhar as alterações celulares e moleculares na relação tabaco/fertilidade.

Palavras-chave: Tabaco; Esperma; Fertilidade Masculina; Espermatogénese; Hormonas; Nicotina.

Abstract

The effect of smoking is a major global health challenge, due to its high prevalence worldwide and to the high morbidity and mortality resulting from its many complications. Since the number of smokers is increasing worldwide, it is important to fully understand the impact on human reproduction as well as the smoking associated risks. The objective of this dissertation is to perform a systematic literature review on the impact of smoking on spermatogenesis and, therefore, in male fertility. We also seek to elucidate the pathophysiological mechanisms contributing to this problem. Several studies have shown that tobacco smoke adversely affects spermatogenesis and, consequently, compromises male fertility. It causes significant changes in sperm DNA and chromosomes, being aneuploidy the most prevalent of all. Smoking is also responsible for changes in semen volume and density, as well as in sperm morphology and mobility. Tobacco smoke is also able to cause changes in secretion and hormone levels, consequently affecting spermatogenesis. It may also be responsible for altering the normal formation of seminal fluid. Based on available publications, it can be concluded that smoking adversely affects sperm quality, once it interferes at various levels in spermatogenesis, thus causing adverse effects on male fertility. Although studies in animal models have shown that smoking is responsible for changes in spermatogenesis and, therefore, in fertility, the pathophysiologic mechanisms leading to these changes remain to be elucidated. Thus, it is necessary to conduct studies aimed at detailing the molecular and cellular changes in the relationship tobacco/fertility.

Key Words: Tobacco; Semen; Male fertility; Spermatogenesis; Hormones; Nicotine.

Aos meus pais, Álvaro Oliveira e Maria do Carmo, pelo apoio incondicional e pela demonstração de grande amizade;

À minha irmã, Raquel Oliveira, sempre positiva e tendo sempre pronto um sorriso.

Agradecimentos

À minha orientadora, Prof. Doutora Sílvia Socorro, pelo apoio, por toda a atenção e disponibilidade que demonstrou e pelos conhecimentos transmitidos durante a realização deste trabalho.

Ao meu co-orientador, Prof. Doutor José Eduardo Cavaco, pelo incentivo, por ter partilhado comigo a sua experiência e, com ela, ter enriquecido o meu trabalho.

À minha namorada, Ana Catarina de Guimarães Ribeiro, presente em todas as etapas deste projecto, abdicando muitas vezes do seu tempo para me auxiliar.

Índice

Introdução	1
Capítulo 1 – Bases anatomo-fisiológicas da fertilidade masculina	3
1.1 – Breve descrição anatômica do testículo	3
1.2 – Espermatogênese: Aspectos celulares	5
1.3 – Regulação Hormonal da espermatogênese	7
Capítulo 2 – Dados epidemiológicos	10
Capítulo 3 – Efeitos do Tabaco na Espermatogênese Humana	13
3.1 – Alterações Cromossômicas e do ADN dos espermatozóides	16
3.2 – Alterações da morfologia e mobilidade dos espermatozóides	18
3.2.1 – Morfologia	18
3.2.2 – Mobilidade	19
3.3 – Consequências no volume e densidade do esperma	21
Capítulo 4 – Efeito do Tabaco em constituintes do fluido seminal	23
4.1 – Vitamina C	23
4.2 – ROS e Leucocitos	24
Capítulo 5 – Efeito do Tabaco no Perfil Hormonal	26
5.1 – Tiróide	26
5.2 – Hipófise	28
5.3 – Hormonas Sexuais	29
Capítulo 6 - Dados experimentais em modelos animais	31
6.1 – Experiências em roedores	31
Conclusão	35
Bibliografia	36

Índice de Figuras

Figura 1.1 – Relações anatómicas do testículo	3
Figura 1.2 – Organização do testículo	4
Figura 1.3 – Organização do testículo	4
Figura 1.4 – Relações anatómicas do testículo.	6
Figura 1.5 – Espermatozóide humano	7
Figura 1.6 – Regulação da secreção das hormonas sexuais do homem	9

Lista de Abreviaturas

- ACTH** – Hormona Adrenocorticotrofina;
- ADN** – Ácido Desoxirribonucleico;
- AVP** – Arginina Vasopressina;
- FISH** – Hibridação *in situ* da fluorescência (Fluorescence *in situ* hybridization);
- FS** – Fosfatidilserina;
- FSH** – Hormona Estimulante do Folículo;
- GH** – Hormona de crescimento;
- HAP** – Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos;
- IL** – Interleucinas;
- LH** – Hormona Luteinizante;
- OMS** – Organização Mundial da Saúde;
- ROS** – Espécies reactivas ao oxigénio (Reactive oxygen species);
- SHBG** – Globulina de ligação à hormona sexual (Sex hormone binding globulin);
- T** – Testosterona
- T3** – Triiodotironina;
- T4** – Tiroxina;
- Tg** – Tiroglobulina;
- TSH** – Hormona libertadora da tirotropina.

Introdução

O consumo de tabaco é actualmente considerado como a principal causa de morte e doença em todos os países do mundo (1). Estima-se que o tabaco seja responsável pela morte de um em cada 10 adultos no mundo inteiro (2). Apesar de o tabaco ser reconhecido como uma das principais causas de mortalidade da actualidade (2), grande parte da população continua a consumir regularmente (3). Aproximadamente 1/3 da população mundial com idade superior a 15 anos são fumadores (4, 5, 6, 7). Para além destes fumadores, há ainda uma proporção de não fumadores que também são afectados pelo fumo libertado pela combustão do cigarro e pelo fumo exalado pelos fumadores. Estes são chamados de fumadores passivos (1, 8, 9).

O fumo do tabaco contém aproximadamente 4000 substâncias químicas diferentes (6), entre elas, nicotina, nitrosaminas, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, cádmio, amónia e monóxido de carbono, assim como vários carcinogénicos e mutagénicos como benzopireno, dimetil-benzantraceno, dimetil-nitrosamina, naftaleno e metil-naftaleno (6, 8, 10, 11). No entanto, a toxicidade de muitos destes constituintes nunca foi avaliada e, por isso, permanecem por identificar a totalidade das repercussões do cigarro e do fumo na saúde (8). A inalação do fumo do cigarro, quer seja de uma forma activa ou passiva, leva à absorção das respectivas substâncias através dos vasos pulmonares, entrando na circulação corporal (1, 12). Deste modo, o fumo do cigarro causa efeitos nefastos em muitos outros sistemas, incluindo o sistema reprodutor masculino (8, 10, 13).

A infertilidade é um problema cada vez mais comum. Afecta 1 em cada 6 casais que tenta engravidar, sendo que em 50% dos casos o factor masculino está envolvido,

seja como problema primário ou em combinação com outras causas de origem feminina (14,15,16). Este aumento de infertilidade que se tem vindo a verificar pode ser devido a diversos factores, havendo autores que apontam hábitos como o fumo do cigarro e o álcool como importantes causadores de alterações na qualidade do esperma (14). É de salientar, que é possível encontrar níveis elevados de cotinina (metabolito da nicotina) no esperma de fumadores (17) em concentrações idênticas às detectadas no sangue (18). Isto demonstra a importância que o consumo do tabaco poderá ter na fisiologia dos espermatozóides em particular, e em todo o processo espermatogénico em geral.

A espermatogénese, ou o processo de formação dos espermatozóides começa por volta dos 13 anos de idade e prossegue durante a maior parte da vida, diminuindo acentuadamente na velhice. Este processo, necessário para o correcto funcionamento da função reprodutora no homem, é assim, a base da fertilidade masculina (16).

O objectivo do presente trabalho é sistematizar a informação existente sobre os efeitos do consumo de tabaco na espermatogénese e, conseqüentemente, na fertilidade masculina. Esperamos igualmente contribuir para o esclarecimento e elucidação dos mecanismos envolvidos no problema supra-citado.

Capítulo 1 – Bases anatomo-fisiológicas da fertilidade masculina

1.1 – Breve descrição anatômica do testículo

Os testículos são órgãos secretores e excretadores destinados a produzir o elemento principal do líquido espermático ou esperma, os espermatozoides - células germinativas masculinas. Produzem também hormonas, das quais se destaca a Testosterona (T), que vão ter um papel importante na determinação dos caracteres sexuais secundários (19, 20).

Os testículos têm forma ovóide e ficam suspensos dentro do escroto por meio dos funículos espermáticos. Encontram-se abaixo do pênis, entre as coxas, na parte anterior do períneo (Figura 1.1). Estão dentro de bolsas constituídas por várias camadas chamadas bolsas escrotais (Figura 1.2). O testículo esquerdo fica ligeiramente mais abaixo do que o do lado direito. São bastante móveis em todos os sentidos. Medem entre 40-45mm de largura e 80mm de altura. Apresentam uma consistência elástica, mole e flácida. Podem considerar-se duas faces (face externa e interna), dois bordos (ântero-inferior e póstero-superior) e duas extremidades (superior e inferior) (19, 20).

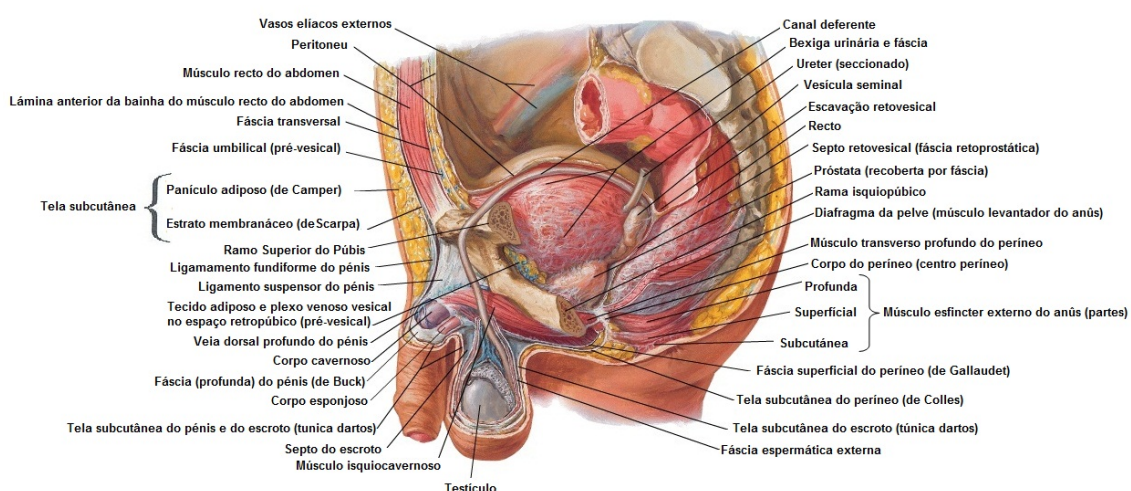


Figura 1.1 – Relações anatômicas do testículo com os órgãos do sistema genital masculino (Adaptado de 21)

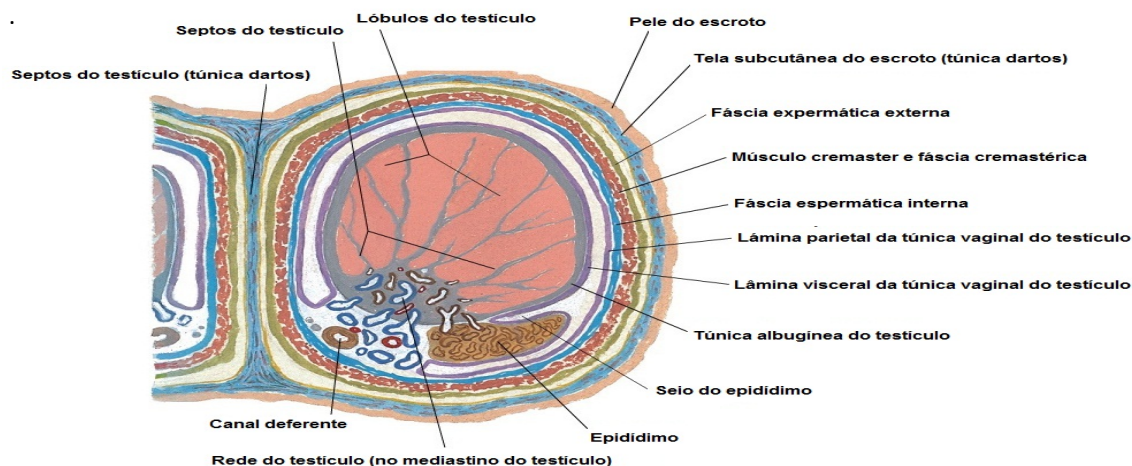


Figura 1.2 – Secção transversal do escroto e testículo mostrando as camadas constituintes das bolsas (Adaptado de 21).

Relativamente à estrutura do testículo (Figura 1.3) podemos distinguir a túnica albugínea, os ductos produtores de esperma e os ductos excretores de esperma. A albugínea é uma túnica fibrosa que circunscreve o tecido próprio do testículo. Os canais produtores de esperma são também designados por túbulos seminíferos ou seminiais. Os túbulos seminíferos organizam-se em lóbulos espermáticos, em número variável, de 220-230, e que se encontram separados por septos fibrosos de albugínea. Em relação aos ductos excretores temos: a Rede de Haller e os vasos eferentes (19, 20).

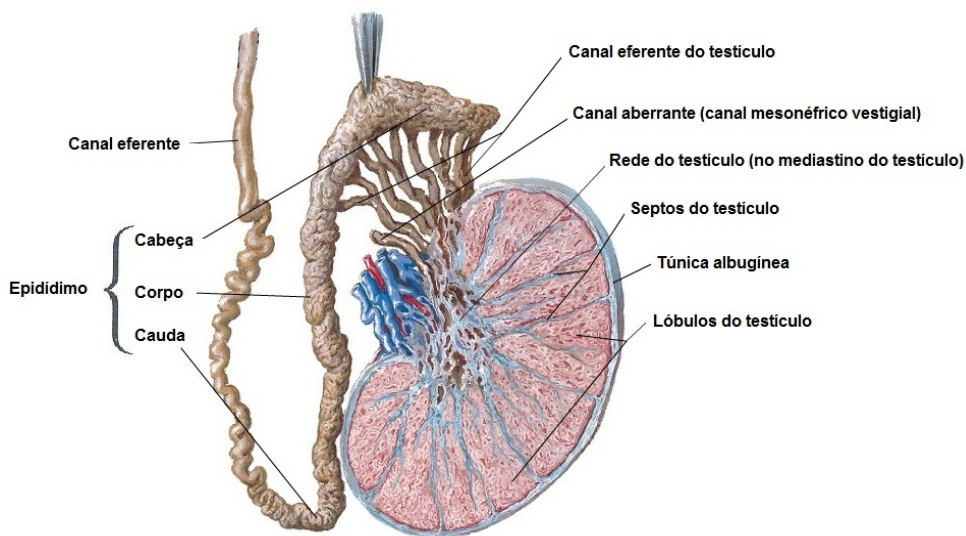


Figura 1.3 – Esquema representativo da organização testicular numa secção frontal (Adaptado de 21).

Os canais eferentes transportam os espermatozóides recém-formados da rede do testículo para o epidídimo, onde são armazenados por períodos curtos até que amadureçam. A cauda do epidídimo é continua com o canal deferente, o qual transporta os espermatozóides do epidídimo para o canal ejaculatório para expulsão na parte prostática da uretra (19, 20).

1.2 – Espermatogénese: Aspectos celulares

A espermatogénese corresponde ao processo de formação dos espermatozóides e ocorre em todos os túbulos seminíferos durante a vida sexual activa, por estimulação das hormonas gonadotróficas da hipófise anterior. Em média começa aos 13 anos de idade e prossegue durante a maior parte da vida, porém, diminui acentuadamente na velhice (22, 23).

Na figura 1.3 encontram-se representadas as etapas da espermatogénese. Os túbulos seminíferos são revestidos por células epiteliais germinativas, as espermatogónias, que se localizam em duas ou três camadas ao longo da superfície tubular interna. Durante a primeira etapa as espermatogónias migram entre as células de Sertoli, para o lúmen central do túbulo seminífero. As células de Sertoli têm barreiras citoplasmáticas que circundam as espermatogónias em desenvolvimento em todo o seu trajecto até ao lúmen central do túbulo. Durante um período de 24 horas, em média, cada espermatogónia que cruza a barreira das células de Sertoli, modifica-se e aumenta de tamanho formando o espermatócito primário. Este, por sua vez, divide-se em dois espermatócitos secundários. Os espermatócitos secundários ao fim de alguns dias dividem-se para originar os espermátides que posteriormente se transformarão em espermatozóides, os quais serão libertados no lúmen dos túbulos seminíferos (22, 23).

Durante a passagem de espermatócito para espermátide, os 46 cromossomas (23 pares de cromossomas) do espermatócito são divididos pelo processo de meiose. Assim, 23 cromossomas vão para um espermátide e os outros 23 para o segundo espermátide. Por isso é que apenas metade das características do futuro feto provém do pai, enquanto a outra metade provém do ovócito da mãe (22, 23).

Todo este período de espermatogénese, desde a célula germinativa até ao espermatozóide, dura cerca de 64 dias (22, 23).

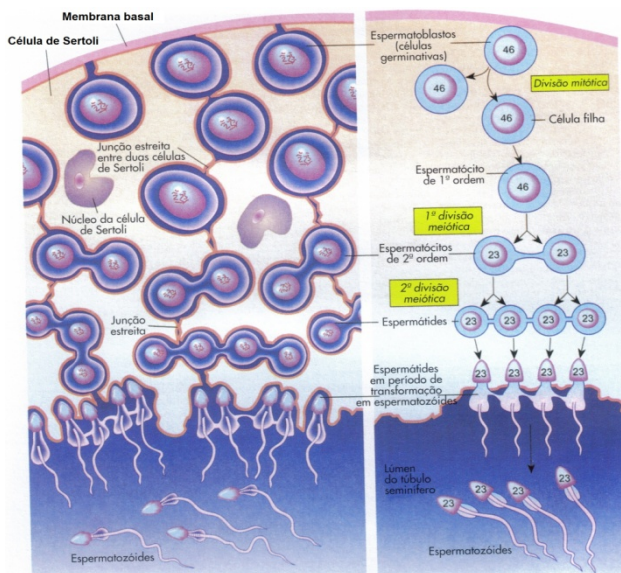


Figura 1.4 – Esquema ilustrativo das etapas da espermatogénese (Adaptado de 24).

A cauda do espermatozóide é responsável pela sua mobilidade e é constituída pela zona do pescoço, parte principal e zona final. Esta cauda é constituída por nove pares de filamentos ou microtúbulos dispostos radialmente em torno de dois centrais. Estes filamentos por sua vez, são rodeados exteriormente por nove fibras grossas, que parecem estar associados aos nove pares de filamentos. Para além deste filamentos, toda a zona principal da cauda é coberta por mitocôndrias que fornecem a energia necessária para a mobilidade do esperma (25).

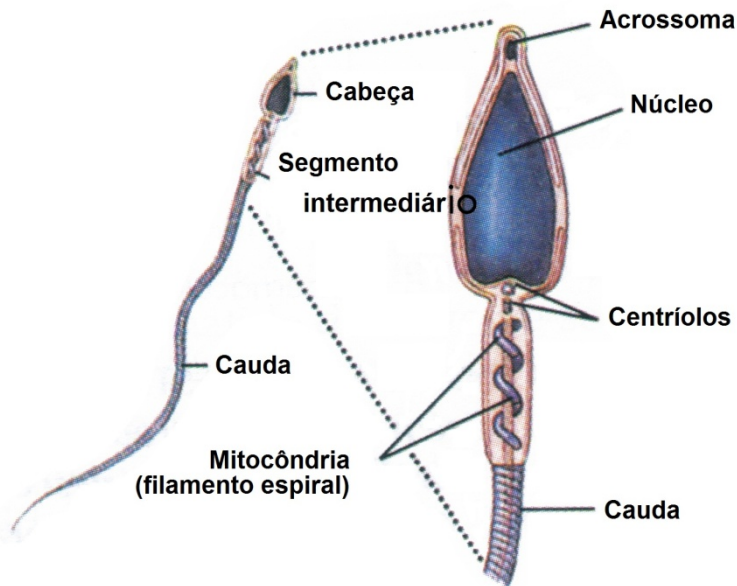


Figura 1.5 – Estrutura de um espermatozóide humano maduro (Adaptado de 24).

1.3 - Regulação Hormonal da espermatogénese

Na puberdade o hipotálamo começa a produzir a hormona libertadora das gonadotrofinas (GnRH), a qual é responsável por iniciar grande parte do controlo das funções sexuais masculinas. A GnRH estimula a hipófise anterior a secretar duas outras hormonas, denominadas hormonas gonadotróficas: a Hormona Luteinizante (LH) e (25) a hormona estimuladora do folículo(FSH) (22, 23).

Os neurónios do hipotálamo secretam a GnRH que é libertada no sistema vascular porta hipotalâmico-hipofisário e transportada até à hipófise anterior, estimulando a libertação de LH e FSH (22, 23).

A GnRH é secretada intermitentemente durante alguns minutos, uma vez em cada 1 a 3 horas. A intensidade deste estímulo depende de dois critérios: i) frequência desses ciclos de secreção; ii) quantidade de GnRH libertada em cada ciclo (22, 23).

A secreção de LH pela hipófise anterior também é cíclica, seguindo a libertação pulsátil da GnRH. Por outro lado, a secreção de FSH aumenta, e diminui, apenas ligeiramente com cada flutuação de secreção de GnRH. Devido à relação muito mais

estreita entre a secreção de GnRH e a de LH, a GnRH também é conhecida como hormona libertadora de LH (22, 23).

A LH é responsável pelo estímulo primário para a secreção de T pelas células intersticiais do testículo, as quais são também denominadas Células de Leydig. A FSH estimula a espermatogénese pela sua acção sobre as células de Sertoli (22, 23).

A espermatogénese é regulada através de mecanismos de feedback ao nível do eixo hipotálamo-pituitária-gónada, exercidos pela T e inibina (Figura 1.4).

Inibição da secreção de LH e FSH da Hipófise Anterior pela T

A T secretada pelos testículos em resposta à acção da LH tem um efeito recíproco de inibir a secreção desta hormona pela hipófise anterior. Esta inibição resulta provavelmente, do efeito directo da T sobre o hipotálamo, que diminui a secreção de GnRH. Assim, há uma diminuição de produção de LH e FSH pela hipófise anterior, e a diminuição de LH reduz a produção de T pelos testículos. Por conseguinte, cada vez que o nível de T aumenta muito, este efeito de feedback negativo automático vai reduzir a secreção de T para o nível desejado. Por outro lado, a T em quantidade insuficiente permite ao hipotálamo secretar grande quantidade de GnRH, o que leva ao aumento de produção de LH e FSH pela hipófise anterior, aumentando assim o nível de T (22, 23).

Controlo da actividade dos túbulos seminíferos por feedback negativo – O papel da inibina

Quando os túbulos seminíferos não conseguem produzir espermatozóides, a secreção de FSH pela hipófise anterior aumenta. Por outro lado quando a espermatogénese ocorre com excessiva rapidez, a secreção hipofisária de FSH diminui (22, 23).

O efeito de feedback negativo sobre a hipófise anterior é devido à secreção pelas células de Sertoli de outra hormona, denominada inibina. Esta hormona actua directamente sobre a hipófise anterior inibindo a secreção de FSH, e sobre o hipotálamo inibindo a secreção de GnRH (22, 23).

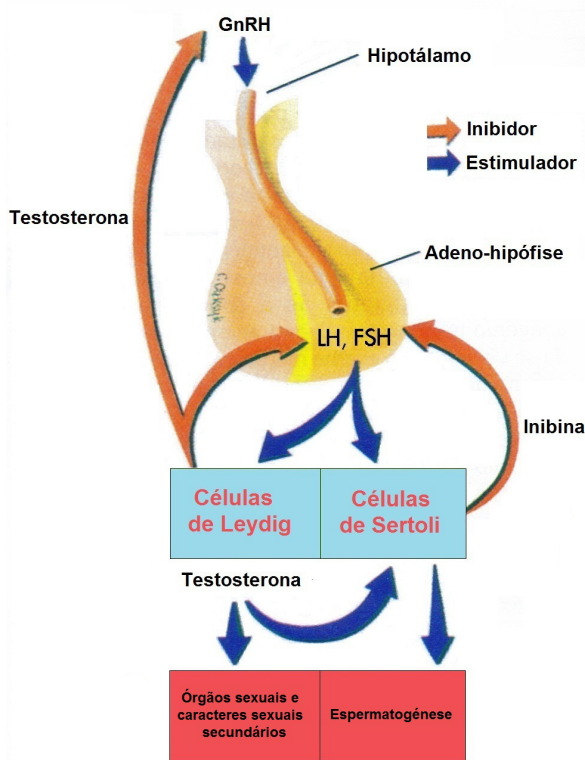


Figura 1.6 – Esquema ilustrativo da regulação da secreção das hormonas sexuais do homem (Adaptado de 24).

Capítulo 2 – Dados epidemiológicos

Em 1981, Evans HJ e co-autores, realizaram o primeiro estudo que demonstrou anormalidades espermáticas em homens fumadores (26). Este estudo provou que os fumadores têm uma percentagem significativa de anormalidades da qualidade do seu esperma, demonstrando que estas alterações espermáticas são fruto da exposição ao fumo do tabaco e aos seus constituintes (27). Muitos outros estudos subsequentes (28, 29, 30, 31) obtiveram resultados idênticos demonstrando os vários efeitos adversos que o fumo do cigarro provoca na qualidade do esperma. Contudo, há alguns estudos (32, 33, 34, 35) que não demonstraram ligação entre o fumo do cigarro e efeitos adversos provocados no esperma. Tal deve-se ao facto de em alguns destes estudos o tamanho da amostra ser de número reduzido e, em outros casos, devido à falta de controlo sobre as relações dose/resposta ou por existirem várias variáveis que pudessem enviesar o estudo em causa (36). A própria investigação sobre o impacto do fumo do tabaco numa população já seleccionada, tendo em conta a fertilidade dessa população pode, por si só, ser um viés para o estudo (36).

Um grupo dinamarquês, Ramlau-Hansen e co-autores, 2007, realizou a análise transversal com o maior grupo de homens saudáveis, que não tinham sido previamente seleccionados, com base na sua história reprodutiva (36). Estes autores verificaram que quanto maior a quantidade de cigarros fumados, menor era a qualidade do esperma (36). Foram observadas diferenças entre os 20-30% em algumas características da qualidade do esperma, tais como: concentração do esperma, volume de esperma, número total de espermatozóides, mobilidade e densidade espermática (36). Tal facto pode explicar o motivo pelo qual em estudos realizados anteriormente com um pequeno tamanho da amostra, não existiram dados com significância

estatística nas alterações da qualidade do esperma (36). Para além disso, estas diferenças podem elucidar a expressão clínica modesta do hábito de fumar em alguns casos (36).

Nos casos de infertilidade, para além das alterações clássicas na qualidade do esperma, o fumo do tabaco pode afectar a qualidade do esperma de outras formas, tais como: diminuir a capacidade do espermatozóide fertilizar o óvulo; aumentar a probabilidade de aborto espontâneo da gravidez antes das 12 semanas; diminuir a taxa de implantação do óvulo, entre outras (37).

Recentemente, foi descrito que a saúde dos descendentes de mãe ou pai com hábito de fumar pode ser afectada negativamente. Embora tenha sido descrito que não há diferença significativa no tempo de engravidar entre os homens que durante a vida uterina foram, ou não, expostos ao fumo do cigarro (38), dados epidemiológicos sugerem diferenças geográficas entre populações no que diz respeito às alterações clássicas do esperma, que podem estar relacionados com a exposição pré-natal a certos constituintes do fumo do tabaco (39). O primeiro estudo com base em dados recolhidos prospectivamente, que avaliou esta associação foi publicado em 2007 (36). Após o ajuste das variáveis, foi observada uma forte associação entre o fumo do tabaco por parte da mãe durante a gravidez e uma redução do número total de espermatozoides na vida adulta (40). Outro estudo, indicou que os homens que foram expostos a mais de 19 cigarros diariamente durante a vida fetal, na vida adulta têm menos 19% de volume de esperma, menos 38% do número total de espermatozoides e uma concentração espermática inferior em 17% comparativamente com um homem que não tenha sofrido qualquer exposição (40). Um eventual processo fitopatológico através do qual a exposição intra-uterina pode prejudicar a espermatogénese na vida

adulta foi recentemente proposta (41). As células fetais germinativas possuem receptores para os HAP (toxinas encontradas no fumo do tabaco) e a exposição destas células aos HAP resulta em apoptose (41). Contudo, verificou-se que há uma associação dependente da dose entre a exposição pré-natal ao fumo do tabaco e o risco de alterações na qualidade espermática (42).

A exposição ao fumo do tabaco de uma forma passiva está associada com a presença de várias doenças em pessoas não fumadoras (43). A nicotina e a cotinina são os biomarcadores usados para detectar a exposição ao fumo passivo do cigarro (43). O tempo de vida curto da nicotina faz com que seja um melhor indicador de uma exposição recente (43). Por sua vez, a cotinina, tem um tempo de vida mais longo, o que a torna mais útil para verificar se houve ou não exposição ao fumo do tabaco nos últimos dois dias (43). Há estudos que indicam que para além do sangue, a nicotina e a cotinina também se encontram no fluido seminal de homens sujeitos ao fumo passivo do cigarro, sofrendo assim todos os efeitos tóxicos provocados por estes (43).

Em 1984, a OMS admitiu que houvesse uma relação entre os homens fumadores e uma baixa taxa de reprodução, recomendando que se criasse um registo de todos os homens que tivessem o hábito de fumar e vivessem uma relação com problemas de fertilidade (33).

Nas duas últimas décadas tem-se vindo a verificar que a qualidade do esperma está a diminuir nos países industrializados em todo o mundo, despertando por isso uma preocupação aumentada no que diz respeito à fertilidade masculina (44). Esse declínio na qualidade do esperma, por ter uma evolução durante um período de tempo relativamente curto, é mais sugestivo de ser uma causa derivada de uma alteração ambiental, como por exemplo, o fumo do tabaco, do que genética (44).

Capítulo 3 – Efeitos do Tabaco na Espermatogénese Humana

A espermatogénese é um processo particularmente sensível a alterações provocadas pelo fumo do cigarro (45), por ser um processo que envolve múltiplas divisões celulares. Quando as células germinativas entram em meiose (I e II), tornam-se vulneráveis à exposição de toxinas ambientais, tais como as do fumo do cigarro (7). As espermatogónias e os espermatócitos têm alguma capacidade de reparar o ADN, e também existem mecanismos de revisão para eliminar células com erros estruturais de reduzida viabilidade (7). Contudo, durante o último estágio de diferenciação celular da espermatogénese, os espermatídios têm pouca ou nenhuma capacidade de reparação celular e, quando a cromatina estiver completamente condensada, é impossível haver reparação do ADN (7). Não tendo nenhuma capacidade de reparação, os espermatozóides ejaculados correm o risco de transmitir alterações genicas à descendência (7). Esta transmissão pode resultar numa falha da implantação uterina, pode comprometer o desenvolvimento uterino do embrião, provocar aborto espontâneo ou distúrbios de desenvolvimento pós-neonatal (7).

Muitos dos componentes tóxicos conhecidos do cigarro são considerados mutagénicos, carcinogénicos e podem afectar adversamente células de divisão rápida, incluindo as células germinativas masculinas (7, 46, 47). Podem induzir defeitos na qualidade do esperma e no ADN do espermatozóide, comprometendo, desta forma, a gravidez (48). Alguns destes componentes tóxicos encontram-se mais elevados no líquido espermático comparativamente com o sangue, facto que só por si pode alertar sobre os efeitos nocivos do fumo do cigarro na espermatogénese humana (49).

Segundo a OMS, para que uma análise do esperma seja considerada anormal deve satisfazer pelo menos uma das seguintes condições: volume inferior a 2,0ml,

concentrações de esperma inferiores a 20×10^6 /ml, contagem total de espermatozóides inferior a 40×10^6 por ejaculação, mobilidade inferior a 50% das células com progressão anterógrada com qualidade inferior a 2 (na escala de 0 a 4) dentro de um período de ejaculação de 60 minutos e morfologia com menos de 30% de formas normais. Os termos oligospermia, astenospermia, teratospermia ou uma combinação dos mesmos referem-se a amostras individuais de esperma com anormalidades no número, mobilidade, morfologia, ou na combinação dos mesmos, respectivamente. Ainda segundo a OMS, a morfologia espermática pode ser classificada como: normal (oval), amorfa (grande ou pequena, ou qualquer defeito), duplicada, ou imatura (15).

A população de fumadores apresenta uma diminuição significativa do volume, densidade, mobilidade dos espermatozóides, assim como aumento de alterações significativas a nível morfológico comparativamente com a população não fumadora (5, 6, 8, 27, 28, 50, 51). A viabilidade dos espermatozóides depende de todos estes parâmetros para cumprir o seu principal objectivo que é atravessar o canal genital feminino e penetrar o óvulo (5). Durante as últimas décadas o número de espermatozóides nos homens tem diminuído universalmente (28, 29). Para além dos factores ambientais, o fumo do tabaco também é responsável por esta alteração (28).

Sabe-se que os aspectos nefastos provocados pelo fumo do cigarro na qualidade do esperma são directamente proporcionais à dose de fumo de cigarro inalado. Assim, quanto maior a quantidade de fumo inalado maior é o decréscimo na qualidade do esperma (5, 6, 8, 9, 32, 36, 52, 53, 54). Este facto pode estar relacionado com o número de substâncias tóxicas contidas no fumo do cigarro, que causam o aumento de radicais livres e do stress oxidativo no esperma (8). Em relação à cotinina (metabolito da nicotina), por exemplo, sabe-se que quanto maior o número de cigarros fumados,

maior é a sua concentração no sangue e no fluido seminal (11) e que se se parar de fumar este valor desce (30).

A exposição ao fumo do cigarro durante o período fetal, pode estar associada à diminuição da qualidade do esperma no futuro (36, 42). A associação entre a diminuição na qualidade do esperma e o fumo do cigarro pode mesmo ser confundida pela exposição pré-natal (36). Estudos indicam que os homens expostos ao fumo do cigarro durante o período pré-natal têm uma diminuição de 20% da concentração e uma diminuição de 25% no número total de espermatozóides (36).

A idade avançada no homem, só por si, é um factor que está associado a uma diminuição no volume, mobilidade e a um aumento de anormalidades a nível morfológico dos espermatozóides, mas não tem qualquer associação com alterações da concentração destes (6).

O fumo de um cigarro contém cerca de 6,67 µg de cádmio (44). Recentemente um estudo provou que este fumo é responsável pelo aumento do metal tóxico no esperma e no sangue, facto que está associado a um maior dano oxidativo e ao mesmo tempo, a uma diminuição dos componentes de defesa anti-oxidantes do esperma (44, 55). Assim, o aumento do cádmio é responsável pela diminuição da qualidade do esperma, do zinco existente no fluido seminal, da concentração de iões de magnésio e da actividade da bomba Ca^{2+} -ATPase na membrana plasmática dos espermatozóides (44, 55).

Sabe-se que o ião zinco tem um papel importante na replicação e transcrição do ADN, bem como, na síntese de proteínas e na divisão e diferenciação celular (44). O deficit deste ião, ou a sua ausência, é considerado um efeito colateral grave do fumo do tabaco (44). Para além disto, a redução da concentração de zinco no esperma, pode

comprometer o nível de zinco da cromatina e, assim, a estabilidade dos espermatozóides (44). Tal facto pode originar falhas na reprodução ou pode trazer consequências para o desenvolvimento fetal (44).

3.1 - Alterações Cromossómicas e do DNA dos espermatozóides

A Aneuploidia é uma das mais comuns e sérias alterações cromossómicas em embriões humanos e descendentes (56, 57). Também é considerada um dos principais defeitos genéticos que pode ser transmitido pelo esperma (58). Embora apenas tenha sido provado em sistemas experimentais, sabe-se que o fumo do cigarro contém substâncias capazes de induzir a aneuploidia (59). Vários estudos têm sido realizados para verificar se há alguma associação entre a aneuploidia do esperma e o fumo do tabaco, usando a técnica de preparação do cromossoma e hibridação *in situ* por fluorescência (FISH, Fluorescence *in situ* hybridization) (56, 60, 61). Esta técnica, com recurso a tiras de ADN de cromossomas específicos tem sido uma forma cada vez mais utilizada para verificar a aneuploidia nas células germinativas masculinas (60). Apenas num destes estudos os dadores de esperma tinham o mesmo estilo de vida, as mesmas características demográficas, diferindo apenas quanto ao facto de serem fumadores, ou seja, a relação entre a aneuploidia e o fumo do cigarro era mais precisa (56). Pôde-se concluir que o fumo do cigarro aumenta o risco de aneuploidia apenas em alguns cromossomas (por exemplo no cromossoma 1 e 13), embora ainda se desconheça o mecanismo exacto que induz a aneuploidia nos cromossomas das células germinativas masculinas (56).

Alguns dos metabolitos do fumo do cigarro podem aumentar os níveis de espécies reactivas de oxigénio (ROS, Reactive oxygen species) no esperma, tendo assim, os homens fumadores, níveis elevados destas partículas no mesmo (9, 62). As

ROS, quando produzidas em níveis fisiológicos são importantes para os espermatozóides, pois dão início ao processo de capacitação. Entretanto, quando produzidas em excesso podem causar danos no esperma. Sabemos que as células espermáticas são altamente susceptíveis a danos provocados por ROS porque a sua membrana plasmática contém muitos ácidos polinsaturados e uma baixa concentração de enzimas peroxidases no citoplasma (46). Para além disso, sabe-se que há uma correlação directa entre fumadores e um alto grau de leucócitos no esperma (52) e que estas são células que geram ROS na ejaculação (46). Assim, o fumo do cigarro pode provocar alterações oxidativas na simetria da membrana plasmática e também danos no ADN de células espermáticas (46). Sabe-se ainda que, células vitais com a membrana celular intacta contêm uma componente fosfolipídica de carga negativa, designada de fosfatidilserina (FS), que normalmente se encontra no lado citosólico da membrana plasmática (46). Um dos distúrbios que pode ser provocado pelas ROS, é a passagem da FS para o lado externo da membrana plasmática, ficando assim esta exposta ao exterior da célula (106). Esta exteriorização marca a célula como apoptótica podendo ser fagocitada por macrófagos (46). A Anexina V é uma proteína com capacidade de se ligar fortemente aos fosfolípidos de carga negativa na superfície celular (desde que haja íons cálcio) com grande afinidade para a FS (46). Esta união, possibilita identificar no esperma células com a membrana celular deteriorada, que é o primeiro sinal para que ocorra apoptose celular (63). A identificação destas células apoptóticas ligadas à Anexina V é feita com um sensibilidade muito elevada (46). Desta forma, podemos afirmar que há uma relação entre os fumadores e a apoptose de células espermáticas, ou seja, os fumadores têm uma elevação significativa de espermatozóides apoptóticos em relação aos não fumadores (46).

O ADN do esperma é estruturado de uma forma especial que mantém o cromossoma muito estável e compacto, dentro do núcleo celular, (48). A integridade do ADN das células espermáticas é essencial para a precisa transmissão da informação genética à descendência (46). As ROS são consideradas partículas mutagénicas que estão envolvidas em muitos processos patofisiológicos (64), por isso os fumadores correm mais riscos de ter defeitos do ADN das células espermáticas do que os não fumadores (64). O estado do ADN do espermatozóide pode ser determinado usando a técnica de electroforese em gel num meio alcalino (65). Este método é capaz de medir quebras no ADN de células espermáticas (46). Sabe-se que os fumadores têm um grau maior de fragmentação do ADN das suas células espermáticas comparativamente com os não fumadores (46) e que esta fragmentação do ADN está relacionada com os níveis elevados de ROS (9, 26, 46, 64). Podemos concluir que o fumo do cigarro causa erros no ADN ou nos cromossomas das células germinativas do homem (7, 26, 60, 64).

3.2 – Alterações da morfologia e mobilidade dos espermatozoides

3.2.1 - Morfologia

O efeito do consumo do cigarro provoca danos na morfologia dos espermatozoides (27), principalmente na forma da cabeça (29). Uma anormal morfologia dos espermatozoides está associada com uma redução na fertilidade humana (66). Anormalidades na morfologia dos espermatozoides são responsáveis pelo aumento do tempo que um casal demora a engravidar, bem como reduzem o sucesso da fertilização *in vitro* (66). Normalmente, quando as alterações na forma dos espermatozoides aumentam, a fertilidade decresce (66).

Estudos demonstraram que há uma relação significativa, entre a concentração de cotinina no fluido seminal e um defeito na morfologia do esperma (11). Outros

estudos demonstraram um aumento da fracção de “espermatozóides de cabeça-redonda”, bem como o aumento da fracção de espermatozóides com dissomia (aneuploidia) na população de fumadores, comparativamente com não fumadores (60).

Uma das alterações da normal morfologia dos espermatozóides dos homens sujeitos ao fumo do tabaco é o completo desaparecimento de um ou mais dos nove pares de filamentos ou microtúbulos existentes no centro da cauda (25), causando assim uma grave deficiência morfológica.

3.2.2 – Mobilidade

Astenospermia ocorre quando temos uma diminuição de cerca de 50% da mobilidade dos espermatozóides numa ejaculação. A mobilidade depende de vários factores, desde a espermatogénese até à normalidade dos fluidos produzidos pelas vesículas seminais e prostáticos, passando pelo funcionamento adequado do epidídimo, local onde estes adquirem a capacidade de se movimentarem. Esta deficiência é a mais comum, embora possa aparecer combinada com a oligospermia e a teratospermia (5). Vários estudos indicam que este é o primeiro defeito a aparecer no esperma de um fumador e que aparece antes do defeito na concentração, no volume e na densidade do esperma (5).

Deficiências na forma do espermatozóide podem provocar uma diminuição da mobilidade, levando a que o tempo que estes demoram a percorrer o sistema reprodutor feminino até à zona da fecundação seja maior (66). Estudos indicam que o fumo do tabaco provoca alterações na normal constituição da cauda do espermatozóide, provocando uma redução da mobilidade espermática e

consequentemente uma redução da taxa de fertilidade, como é observado em pessoas com astenospermia (25).

O dano provocado pelo stress oxidativo, mais particularmente pelas ROS, na membrana do esperma é responsável pela perda permanente da normal mobilidade do esperma (8). Há uma diminuição de 18,7% da mobilidade total nos espermatozóides de fumadores comparativamente com os não fumadores (49). O facto de os fumadores terem um grau elevado de cádmio no esperma, pode provocar efeitos tóxicos de tal forma que só por si podem originar astenospermia (44).

Uma concentração de cotinina no fluido seminal de 400-800 ng/ml prejudica a mobilidade dos espermatozóides, bem como a função da membrana celular (49, 67). Ao prejudicar a membrana celular, os níveis elevados de cotinina contribuem para um defeito na cascata de eventos que constituem a activação do espermatozóide e consequentemente para a sua capacidade de fertilizar o óvulo (67), bem como para um defeito na sua mobilidade (49, 67). Considerando que a concentração de cotinina no esperma de quase todos os fumadores é superior a 400ng/ml (68), pode-se afirmar que esta contribui para um prejuízo da capacidade de fertilização dos fumadores (49, 67).

O cálcio desempenha um papel preponderante na regulação de processos funcionais da espermatogénese e da fecundação, incluindo a reacção acrossómica e a mobilidade espermática (44). O gradiente de cálcio na membrana plasmática, requerido para que haja homeostasia deste é mantido em parte pela actividade da bomba Ca^{2+} -ATPase (44). Nas células somáticas, a actividade desta bomba de cálcio pode ser afectada pela presença de metais pesados, especialmente o cádmio (44). Este metal provoca extensos danos na membrana plasmática, incluindo o decréscimo da

actividade das bombas de Ca^{2+} -ATPase da membrana plasmática, que são as indicadoras da função desta nos testículos (44). O facto de estudos indicarem que a actividade da bomba Ca^{2+} -ATPase se encontra reduzida em pessoas sujeitas ao fumo do tabaco devido ao aumento da concentração de cádmio e o facto de haver uma diminuição da mobilidade espermática em fumadores, sugere uma associação entre o fumo do cigarro e a mobilidade espermática diminuída (44). Assim a actividade da bomba Ca^{2+} -ATPase da membrana plasmática tem uma associação com a regulação da mobilidade dos espermatozóides (44).

3.3 – Consequências no volume e densidade do esperma

Vários estudos indicam que o primeiro defeito a surgir no esperma dos fumadores é uma diminuição do seu volume, que deve aparecer antes do defeito na concentração, na mobilidade e na morfologia espermática (4).

Há evidências que indicam que os fumadores possam ter uma vida sexual mais activa do que os não fumadores, possivelmente devido ao facto de terem os níveis de T um pouco mais elevados (29, 55). Assim, a frequência de ejaculações é maior. Tal facto, só por si, pode diminuir a densidade e o volume de esperma dos fumadores (29, 55).

O número de espermatozóides também pode variar com a temperatura, sendo maior por essa razão o seu número durante o Inverno e menor durante o Verão (29).

O fumo do cigarro está associado a uma baixa densidade espermática (29, 69) e a uma diminuição do volume de esperma comparativamente com não-fumadores da mesma idade (29, 70). Foi demonstrado que há uma diminuição de 13-17% da densidade do esperma nos fumadores, embora não se saiba ao certo qual a dose diária de cigarros que é necessário fumar para que haja esta diminuição da densidade (69).

Foi ainda demonstrado que há uma diminuição de 29% do número total de espermatozóides e de 19% na concentração espermática nos homens que fumam mais do que 20 cigarros por dia (36) comparativamente com os não fumadores.

Sabe-se que o dano provocado pelo excesso de ROS no esperma pode provocar apoptose nas células germinativas, o que vai levar a um decréscimo do número de espermatozóides produzidos e consequentemente a um decréscimo do volume espermático (8).

Como já referido, o tabaco contém uma concentração de cádmio relativamente elevada, de tal forma que os fumadores têm uma concentração deste metal pesado no sangue mais elevada do que os não fumadores (44, 55). Esta diferença de concentração de cádmio também se verifica no esperma humano (44,55). Vários estudos observaram que este metal afecta o volume e a densidade do esperma, provocando uma diminuição destes parâmetros no esperma dos fumadores que fumam mais de 100 cigarros por ano (44).

Capítulo 4 – Efeito do Tabaco em constituintes do fluido seminal

Uma das particularidades notáveis do fluido seminal humano, é a sua alta concentração de algumas substâncias orgânicas e enzimas, como a frutose, ácido cítrico, glicerofosfocolina, fosfatase ácida, 5'-nucleotidase e vitamina C.

4.1 – Vitamina C

A Vitamina C é um elemento fundamental em diversas funções biológicas com importância tanto a nível biológico como a nível clínico. O fluido seminal humano contém cerca de 10mg/dl de Vitamina C, que é um valor superior ao existente no plasma sanguíneo (0.6-2.5mg/dl). Estudos indicam que os níveis de Vitamina C necessários para proteger a formação, maturação e libertação dos espermatozóides das espécies reactivas de oxigénio endógenas dos espermatozóides são mínimos e que a vitamina C é o principal anti-oxidante extra-celular hidrossolúvel. Amostras de esperma com necrospermia e azoospermia aparentemente contêm menor quantidade de Vitamina C comparativamente com esperma normal. Além disso, a Vitamina C no fluido seminal reduz certas aglutininas do esperma não específicas, e garante o revestimento molecular da cabeça do espermatozóide. A vitamina C exerce ainda funções protectoras na camada do epitélio germinativo e na cauda do epidídimo, onde ocorre a maturação dos espermatozóides (71).

O fumo do cigarro está associado a um aumento de 107% dos níveis de ROS, e a uma diminuição de 10 pontos da capacidade antioxidante das ROS (9), o que juntamente com a adição de ROS através de fontes exógenas cria uma obrigação correspondente para um aumento de Vitamina C, uma vez que este é um elemento essencial antioxidante no fluido seminal (71). Estudos demonstraram que nos homens o fumo do tabaco está associado a um decréscimo de 20-40% da Vitamina C no

sangue, facto que nos faz concluir que a compensação antioxidante por parte da Vitamina C não é realizada, dando assim lugar um maior número de alterações na qualidade do esperma (28). Outros estudos sugeriram que os suplementos de Vitamina C em homens que estão sujeitos vigorosamente ao fumo do cigarro melhoraram a qualidade do esperma (71), dado que suporta a constatação anterior.

4.2 – ROS e Leucocitos

O fumo do cigarro está correlacionado com o aumento dos níveis de stress oxidativo do esperma, devido à diminuição da capacidade total antioxidante das ROS. Estudos recentes, indicam que a capacidade total antioxidante das ROS diminui como resultado de um desequilíbrio entre os níveis de ROS e as espécies antioxidantes presentes no esperma. A significativa redução da capacidade total antioxidante associada com o fumo do cigarro pode ser atribuída ao aumento das ROS no fluido seminal (9).

Um factor adicional que pode explicar o porquê do esperma de homens expostos ao fumo do cigarro ter níveis elevados de ROS, pode ser o facto de o fumo só por si conter valores altos de ROS, como por exemplo o anião superóxido, o peróxido de hidrogénio e radicais de hidrogénio. O facto de os níveis de stress oxidativo estarem aumentados devido ao fumo do cigarro tem um significado e pode ter importantes implicações no potencial de fertilização dos homens inférteis (9).

A ligação entre o fumo do cigarro e o aumento dos níveis seminais de ROS, pode estar relacionada com o aumento significativo da concentração de leucócitos no esperma de homens inférteis. Uma possível explicação é que os metabolitos presentes no fumo do cigarro podem induzir uma reacção inflamatória no canal genital masculino, com uma subsequente libertação de mediadores químicos da inflamação.

Mediadores inflamatórios, como as IL-6 e a IL-8, podem recrutar e activar leucócitos. Por sua vez, os leucócitos activos podem gerar concentrações elevadas de ROS no fluido seminal, que podem ultrapassar a capacidade antioxidante, resultando em stress oxidativo. Outra possível explicação é o facto dos componentes tóxicos do fumo do cigarro poderem perturbar a espermatogénese, resultando numa produção de espermatozóides com defeito. Neste caso, os leucócitos infiltram-se no sistema reprodutor masculino para eliminar os espermatozóides com defeito por fagocitose (9).

Capítulo 5 – Efeito do tabaco no perfil hormonal

Fumar tem um efeito sobre os diversos processos metabólicos e biológicos no corpo humano, incluindo na secreção de hormonas. Estes processos são mediados principalmente através do comportamento e das acções farmacológicas da nicotina mas também podem ocorrer como resultado do aumento do efeito físico do stress provocado no organismo pelo fumo do cigarro. Em homens normais, o fumo do cigarro causa um aumento da frequência cardíaca e da tensão arterial como resultado da constrição dos vasos sanguíneos. Tem tendência a aumentar a concentração de ácidos gordos na circulação sanguínea e também de estimular a adesão das plaquetas entre si e às paredes dos vasos sanguíneos. A nicotina também causa a estimulação e/ou a inibição do sistema nervoso central, sendo estes efeitos dependentes da dose administrada. O monóxido de carbono presente no fumo do tabaco tem uma grande afinidade com a hemoglobina, reduzindo a capacidade desta armazenar e transportar o oxigénio entre os tecidos corporais. Para além destes efeitos, o fumo do cigarro é responsável pela alteração das hormonas e por isso, em todos os homens que tenham problemas endócrinos, é importante haver uma história detalhada acerca dos hábitos de fumar (72).

5.1 – Tiróide

Durante muitos anos o testículo foi considerado um órgão insensível às hormonas da tiróide. Actualmente esta visão encontra-se ultrapassada, sendo reconhecido que as hormonas da tiróide desempenham uma função importante no desenvolvimento e função testicular, estando envolvidas na regulação da esteroidogénese assim como na espermatogénese (73).

O fumo do cigarro tem múltiplos efeitos na glândula tiroideia (74). Pode estimular ou inibir a sua função e também é um factor de risco elevado para o desenvolvimento de doenças da tiróide (74). Oftalmopatia de Graves e uma anormal proliferação de hormonas, são todas possíveis consequências originadas pelo fumo do cigarro (74).

Em adultos normais, o fumo do cigarro ou funciona como um estimulante fraco ou então não tem qualquer efeito sobre a função da tiróide e no seu tamanho. No entanto, pode ocorrer um aumento da concentração de certas hormonas tiroideias, nomeadamente da triiodotironina (T3) e da tiroglobulina (Tg) (74). Um dos mecanismos que pode provocar este aumento de produção é a acção estimulante da nicotina sob sistema nervoso simpático (75). Homens sujeitos ao fumo do cigarro que não tenham sinais nem sintomas característicos do aumento ou diminuição da actividade da tiróide, caso tenham o nível hormonal tiroideio elevado, este pode ser devido ao efeito do fumo do cigarro e não ser provocado por uma doença intrínseca da tiróide (75).

Há vários mecanismos capazes de explicar o aumento do nível de hormonas tiroideias provocado pelo fumo do cigarro (76). Como já foi descrito, o fumo do cigarro contém várias toxinas, tais como o tiocianato e a 2,3-hidroxipiridina que podem provocar aumentos na secreção hormonal da tiróide. O tiocianato, que tem uma meia-vida de mais de 6 dias, inibe o transporte do iodeto e a sua organificação, bem como o aumento e a saída de iodeto da glândula. Na presença de um baixo grau de iodeto, o tiocianato pode provocar bócio e desta forma descontrolar a produção de hormonas tiroideias. A 2,3-hidroxipiridina, por outro lado, inibe a deiodinação da tiroxina (T4) limitando a actividade da iodotironina desiodase (77). Este efeito pode aumentar

ligeiramente, mas temporariamente os níveis plasmáticos da T4 como resultado da actividade alterada da desidase (75).

5.2 – Hipófise

O fumo do cigarro estimula a produção de várias hormonas quer da hipófise anterior, quer da posterior. Aumenta os níveis plasmáticos da prolactina (PRL), da adrenocorticotrofina (ACTH), hormona de crescimento (GH) (78) e também, embora menos significativamente, a hormona libertadora da tirotropina (TSH), LH e FSH (36, 78). Estes efeitos são directamente proporcionais ao nível de nicotina que os cigarros contêm, como maior produção a nível hormonal nos fumadores de cigarros com maior concentração de nicotina (79). Há quatro potenciais mecanismos que podem causar estes efeitos. Em primeiro lugar, a náusea causada pelo fumo do cigarro pode provocar um aumento de cortisol, GH, da PRL e de hormonas antidiuréticas com efeitos muito semelhantes àqueles que acompanham as náuseas e os vómitos numa rotação rápida (78). Os processos neuroquímicos que ocorrem com a náusea são coordenados pelo centro emético situado no tronco cerebral. Sabe-se que a nicotina funciona como um estimulador do centro emético podendo, desta forma, o fumo do cigarro contribuir para provocar náusea e vómitos. Outro possível mecanismo é a estimulação da produção de AMP cíclico pela nicotina (79). O stress só por si também pode causar a produção aumentada destas hormonas. Um efeito directo da nicotina ou dos neurotransmissores libertados pela nicotina actuando sobre o hipotálamo ou sobre a hipófise anterior, é outra possibilidade para justificar o aumento da produção hormonal (78).

Em fumadores crónicos, contudo, ocorre a inibição da secreção de PRL. Este efeito inibitório provocado pela exposição crónica da nicotina é devido à activação de

receptores nicotínicos nos neurónios da dopamina túbero-infundibulares, libertando dopamina como um factor inibidor da secreção de PRL (80). Assim, os níveis basais de PRL são mais baixos em fumadores crónicos comparativamente com não fumadores, o que pode contribuir para uma redução na fertilidade masculina (62). Em alguns estudos, verificou-se ainda que a hipoprolactinémia pode afectar a produção de LH e influenciar a função testicular afectando directamente a produção de T e de esperma (62).

Como já foi dito, com o fumo do cigarro, os níveis de LH e FSH aumentam. Estudos indicaram que juntamente com este aumento se verifica o aumento da inibina B. Teoricamente, segundo o sistema hipófise-hipotálamo-gónadas, um aumento da FSH e da LH inicialmente iria causar um aumento da T e da inibina B. Subsequentemente, por feedback negativo, ocorreria um decréscimo da LH e da FSH. Curiosamente alguns estudos indicam que certos constituintes do fumo do cigarro podem perturbar o normal funcionamento deste feedback negativo, não ocorrendo assim uma descida da concentração de LH e FSH (36).

5.3 – Hormonas Sexuais

Nos homens, o efeito do tabaco sobre a concentração dos androgénios é importante, não só pelo efeito que provoca na fertilidade masculina, mas também devido ao recente interesse na associação entre os baixos níveis de androgénios com a síndrome metabólica e a doença cardíaca coronária (81). A T tem um ritmo circadiano com picos entre as 06h00 e as 08h00, atingindo os níveis basais entre as 18h00 e as 20h00. Uma proporção significativa da T circulante total é inactiva, estando ligada à Globulina de ligação às hormonas sexuais (SHBG, sex hormone binding globulin, 65-80%), enquanto que a fracção biologicamente activa circula livremente (1-3%) ou

acoplada à albumina (20-40%). A T que circula livremente mais a fracção acoplada à albumina é chamada de T biodisponível. Assim, os níveis de T total podem ser afectados por mudanças nos níveis séricos de SHBG e outras proteínas plasmáticas. Vários estudos detectaram um aumento dos níveis de T, em homens sujeitos ao fumo do tabaco (35, 62, 81, 82). Num destes estudos, verificou-se que o aumento da T total é devido ao aumento dos níveis basais de SHBG. Também descreveram que os níveis de SHBG é que servem como medida para o fumo do cigarro e não a correlação entre os níveis de nicotina no sangue e a concentração de T (81).

Uma explicação para o aumento da concentração de T em homens sujeitos ao fumo do tabaco é devido à activação central das células de Leydig pela LH, que também sofre um aumento devido ao fumo do cigarro. Verificou-se que os homens que sejam capazes de reduzir ou mesmo de parar de fumar, têm uma diminuição significativa dos níveis de T. Este facto suporta a hipótese de que um valor da concentração de T elevado constitui um factor de risco para a saúde do homem, assim como fumar. Por outro lado, pode tornar mais fácil aos homens que têm baixos níveis de T a abstenção de fumar (62).

Capítulo 6 – Dados experimentais em modelos animais

Muitos estudos têm sido realizados sobre o efeito do fumo do cigarro e os danos que este provoca em diferentes partes do corpo e do sistema reprodutor masculino de homens e animais (12, 83, 84, 85). Nos estudos em modelos animais foram avaliados diferentes métodos de exposição ao fumo e a duração do período de exposição. Os resultados mostraram que há apoptose celular nos testículos dos progenitores, redução do número e do tamanho epitelial das células germinativas, alterações nas mitocôndrias das células germinativas, um aumento de radicais livres de oxigênio no esperma, entre outros problemas associados ao fumo do cigarro (30, 68, 84, 86, 87).

Devido a questões de ética e à falta de acesso a tecido testicular, os estudos com material humano são difíceis de concretizar. Assim, foram avaliados os potenciais riscos e complicações do fumo do cigarro sobre a fertilidade masculina em modelos animais mamíferos, nomeadamente em ratos. Devido à semelhança dos tecidos testiculares entre os seres humanos e os ratos, vários estudos usaram este animal como cobaia (83).

A utilização de modelos animais permite um controlo absoluto sobre várias variáveis de perturbação nos resultados dos estudos, variáveis estas, que são difíceis de eliminar em estudos realizados com humanos, tais como o fumo passivo e a exposição a outras toxinas, como as do café e o álcool (88).

6.1 – Experiências em roedores

O fumo do cigarro provoca alterações na espermatogénese nos testículos de ratos. Alguns estudos verificaram que ratos sujeitos cronicamente ao fumo do cigarro têm um menor número de células germinativas, menor tamanho das células epiteliais germinativas, menor diâmetro dos túbulos seminíferos e um aumento da apoptose das

células dos testículos, que podem ser mecanismos patogénicos responsáveis pela deficiente espermatogénese (86). Outros verificaram ainda uma redução na condensação e mobilidade dos espermatozóides, disfunção das células de Leydig, e redução da capacidade do sistema genital na secreção de hormonas (68). Estas alterações podem ser devido à presença de substâncias tóxicas existentes no fumo do cigarro que afectam todos os tecidos, incluindo os testículos. Para além disto, o fumo do cigarro provoca uma hipoxia corporal generalizada, facto que pode ser outro factor negativo que afecta a espermatogénese nos ratos (84).

Demonstrou-se que o cádmio e o chumbo, afectam a espermatogénese. Algumas publicações reportaram o efeito combinado da exposição ao chumbo e ao cádmio, ambos presentes na constituição do fumo do tabaco. Concluíram que o cádmio só por si pode provocar alterações na espermatogénese, danificar o tecido testicular e reduzir a fertilidade. Nos estudos em que os ratos eram expostos ao combinado de chumbo e cádmio, estes exibiam mais patologia relacionada com alterações na qualidade do esperma, nomeadamente uma redução no número total de espermatozóides comparativamente com a exposição a um destes metais isoladamente (55).

Noutras experiências, a exposição de ratos ao fumo do cigarro resulta numa secreção deficiente das células de Sertoli e das de Leydig juntamente com uma deficiente maturação dos espermatozóides no epidídimo (88). Uma possível explicação pode ser o efeito das substâncias tóxicas que constituem o fumo do cigarro ou devido à hipoxia induzida pelo fumo do cigarro nos tecidos (84). Observaram-se grandes reduções da fertilidade *in vivo* e da fertilização *in vitro*. Injecções intracitoplasmáticas de espermatozóides são capazes de superar as limitações da fertilização *in vitro* e originar um desenvolvimento embrionário inicial aparentemente normal. No entanto,

verifica-se que há sempre um potencial de implantação reduzido dos embriões obtidos a partir de ratos sujeitos ao fumo do cigarro, independentemente da técnica de fertilização *in vitro* utilizada (88). De salientar que estudos realizados em seres humanos chegaram a uma conclusão semelhante (37).

O aumento das mutações hereditárias da linha germinativa da sequência de ADN em indivíduos expostos ao fumo do cigarro foi estudado em ratos. Animais expostos tiveram frequência de mutações nas células germinativas, as espermatogónias significativamente maior. Os dados sugerem que as mutações se acumulam com a exposição prolongado ao fumo do cigarro. Este tipo de mutações pode estar associado a um aumento da incidência de doenças genéticas entre os descendentes não sujeitos ao fumo do cigarro de progenitores masculinos sujeitos ao fumo do cigarro (89). Em seres humanos, os progenitores sujeitos ao fumo do cigarro correm um risco maior de a sua descendência masculina, para além de poder ter alterações na qualidade do esperma, ter cancro na infância, que são condições conhecidas por estarem ligadas a mutações genéticas (90).

Ratos expostos à nicotina contida no fumo do cigarro, mostraram uma associação entre esta e uma inibição de produção de T. Este efeito é proporcional à dose de nicotina. O baixo nível de T foi atribuído à degeneração das células de Leydig e à sua diminuição de número devido à exposição ao fumo do cigarro (91).

A exposição ao fumo do cigarro em ratos causa um aumento moderado agudo no fluxo sanguíneo dos vasos testiculares e inibe a sua vasoconstrição. Após a exposição, o fluxo sanguíneo e a vasoconstrição voltam aos parâmetros normais. O facto de o fumo do cigarro influenciar a microcirculação dos vasos dos testículos é

discutido em vários estudos como sendo um possível efeito adverso sobre a espermatogénese (92).

Num estudo em que se procedeu à extracção de testículos de ratos previamente expostos ao fumo do cigarro, verificou-se uma evidente degeneração e dissociação das células espermatogénicas, uma alteração da configuração normal dos espermátocitos primários, das células de Leydig e Sertoli. A própria lâmina basal dos túbulos seminíferos encontrava-se espessada e significativamente irregular, bem como se verificou uma anormal estrutura do seu epitélio. Os resultados indicaram que a inalação do fumo do cigarro por parte dos ratos causa lesões específicas no normal desenvolvimento do espermatozóide e pode ser directa ou indirectamente tóxico para a espermatogénese (93).

Devido à semelhança metabólica que há entre os tecidos do testículo do rato e do homem, pode-se concluir que o fumo do cigarro afecta a processo de desenvolvimento do esperma de igual forma no homem (84).

Conclusão

De acordo com os dados revistos neste trabalho, o fumo do cigarro é um agente mutagénico e carcinogénico que pode afectar negativamente a espermatogénese e, conseqüentemente, a fertilidade masculina.

São muitos os componentes tóxicos conhecidos do fumo do cigarro e estes produzem alterações nos espermatozóides em vários níveis, nomeadamente alterações cromossómicas, da morfologia, da mobilidade, bem como alterações do volume e da densidade do esperma. Para além dos espermatozóides, também em outros compostos do fluido seminal são encontrados defeitos associados ao consumo do tabaco. Entre estes destacam-se os relacionados com o stress oxidativo, incluindo a vitamina C, ROS e os leucócitos. Contudo, os efeitos do fumo do tabaco não se limitam a uma acção directa sobre o testículo e o esperma, interferindo este também com a fertilidade de um modo indirecto por induzir alterações no perfil hormonal. Destaca-se a sua influência nas hormonas tiroideias, sexuais e no eixo hipotálamo-hipofisário.

Em animais expostos cronicamente ao fumo do tabaco estão documentadas várias alterações que constituem prováveis mecanismos patogénicos responsáveis por deficiente espermatogénese. No entanto, é necessário confirmar estes achados em humanos e realizar futuros estudos que detalhem as alterações provocadas pelo fumo do cigarro a nível celular e molecular. Assim como, realizar estudos que avaliem a qualidade do esperma de ex-fumadores, facto que poderia contribuir de uma forma positiva para incentivar a deixar de fumar.

Bibliografia

- (1) Zavos PM, Zarmakoupis-Zavos PN. Impact of cigarette smoking on human reproduction: Its effect on male and female fecundity. *Thecnology* 1999;6:9-16.
- (2) Whorld Health Organization. Fact sheet N°310. [Online]. 2004 [cited 2010 Fev 10]; Available from: URL:<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/index.html>
- (3) Whorld Health Organization. Tobacco key facts. [2010?] [cited 2010 Fev 10]; Available from: URL:<http://www.who.int/topics/tobacco/facts/en/index.html>
- (4) Pasqualotto FF, Sobreiro BP, Hallak J, Pasqualotto EB, Lucon AM. Cigarette smoking is related to a decrease in semen volume in a population of fertile men. *BJU Int* 2006;97(2):324-6.
- (5) Gaur DS, Talekar M, Pathak VP. Effect of cigarette smoking on semen quality of infertile men. *Singapore Med J* 2007;48(2):119-23.
- (6) Künzle R, Mueller MD, Hänggi W, Birkhäuser MH, Drescher H, Bersinger NA. Semen quality of male smokers and nonsmokers in infertile couples. *Fertil Steril* 2003;79(2):287-91.
- (7) Zenzes MT. Smoking and reproduction: gene damage to human gametes and embryos. *Hum Reprod Update* 2000;6(2):122-31.
- (8) Colagar AH, Jorsaraee GA, Marzony ET. Cigarette smoking and the risk if male infertility. *Pak J Biol Sci* 2007;10(21):3870-4.
- (9) Saleh RA, Agarwal A, Sharma RK, Nelson DR, Thomas AJ Jr. Effect of cigarette smoking on levels of seminal oxidative stress in infertile men: a prospective study. *Fertil Steril* 2002;78(3):491-9.
- (10) Attia AM, el-Dakhly MR, Halawa FA, Ragab NF, Mossa MM. Cigarette smoking and male reproduction. *Arch Androl* 1989;23(1):45-9

- (11) Wong WY, Thomas CM, Merkus HM, Zielhuis GA, Doesburg WH, Steegers-Theunissen RP. Cigarette smoking and the risk of male factor subfertility: minor association between cotinine in seminal plasma and semen morphology. *Fertil Steril*. 2000;74(5):930-5.
- (12) Stillman RJ, Rosenberg MJ, Sachs BP. Smoking and reproduction. *Fertil Steril* 1986;46(4):545-66.
- (13) Soares SR, Melo MA. Cigarette smoking and reproductive function. *Current Opinion in Obstetrics and Gynecology* 2008;20:281–291.
- (14) Brugo-Olmedo S, Chillik C, Kopelman S. Definition and causes of infertility. *Reprod Biomed Online* 2001;2(1):41-53.
- (15) World Health Organization WHO Laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction, Cambridge, Cambridge University Press, 1999.
- (16) Shefi S, Turek PJ. Definition and current evaluation of subfertile men. *Int Braz J Urol* 2006;32(4):385-97
- (17) Wall MA, Johnson J, Jacob P, Benowitz NL. Cotinine in the serum, saliva, and urine of nonsmokers, passive smokers, and active smokers. *Am J Public Health* 1988;78(6):699-701.
- (18) Vine MF, Hulka BS, Margolin BH, Truong YK, Hu PC, Schramm MM, et al. Cotinine concentrations in semen, urine, and blood of smokers and nonsmokers. *Am J Public Health* 1993;83(9):1335-8.
- (19) Moore KL, Dalley AF. *Anatomia Orientada para a Clínica*. Rio de Janeiro (RJ). Guanabara Koogan SA; 1999
- (20) Esperança Pina JA. *Anatomia Humana dos Órgãos*. Lisboa (Portugal). Lidel; 2004.

- (21) Netter F. Atlas of Humanan Anatomy. 4rd ed. PLACE OF PUBLICATION; Elsvier; 2006.
- (22) Guyton AC, Hall JE. Tratado de Fisiologia Médica. 10ª ed. Rio de Janeiro (RJ). Guanabara Koogan SA; 2002.
- (23) Saladin, KS. Anatomy and Physiology: the unit of form and function. New York. McGraw-Hill; 2001
- (24) Seeley RR, Stephens TD, Tate, P. Anatomia & Fisiologia. 3rd ed. Lisboa (Portugal); Lusodidacta; 1997.
- (25) Zavos PM, Correa JR, Karagounis CS, Ahparaki A, Phoroglou C, Hicks CL, e tal. An electron microscope study of the axonemal ultrastructure in human spermatozoa from male smokers and nonsmokers. Fertil Steril 1998;69(3):430-4.
- (26) Shen HM, Chia SE, Ni ZY, New AL, Lee BL, Ong CN. Detection of oxidative DNA damage in human sperm and the association with cigarette smoking. Reprod Toxicol 1997;11(5):675-80.
- (27) Evans HJ, Fletcher J, Torrance M, Hargreave TB. Sperm abnormalities and cigarette smoking. Lancet 1981;1(8221):627-9.
- (28) Kulikauskas V, Blaustein D, Ablin RJ. Cigarette smoking and its possible effects on sperm. Fertil Steril 1985;44(4):526-8.
- (29) Chia SE, Ong CN, Tsakok FM. Effects of cigarette smoking on human semen quality. Arch Androl 1994;33(3):163-8.
- (30) Sofikitis N, Miyagawa I, Dimitriadis D, Zavos P, Sikka S, Hellstrom W. Effects of Smoking on Testicular Function, Semen Quality and Sperm Fertilizing Capacity. J Urol 1995;154(3):1030-4.

(31) Shaarawy M, Mahmoud KZ. Endocrine profile and semen characteristics in male smokers. *Fertil Steril* 1982;38(2):255-7.

(32) Dikshit RK, Buch JG, Mansuri SM. Effect of tobacco consumption on semen quality of a population of hypofertile males. *Fertil Steril* 1987;48(2):334-6.

(33) Dunphy BC, Barratt CL, von Tongelen BP, Cooke ID. Male cigarette smoking and fecundity in couples attending an infertility clinic. *Andrologia* 1991;23(3):223-5.

(34) Battista N, Rapino C, Di Tommaso M, Bari M, Pasquariello N, Maccarrone M. Regulation of male fertility by the endocannabinoid system. *Mol Cell Endocrinol* 2008;286(1-2 Suppl 1):S17-23.

(35) Vogt HJ, Heller WD, Borelli S. Sperm quality of healthy smokers, ex-smokers, and never-smokers. *Fertil Steril* 1986;45(1):106-10.

(36) Ramlau-Hansen CH, Thulstrup AM, Aggerholm AS, Jensen MS, Toft G, Bonde JP. Is smoking a risk factor for decreased semen quality? A cross-sectional analysis. *Hum Reprod* 2007;22(1):188-96.

(37) Zitzmann M, Rolf C, Nordhoff V, Schröder G, Rickert-Föhning M, Gassner P, Behre HM, Greb RR, Kiesel L, Nieschlag E. Male smokers have a decreased success rate for in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 2003;79Suppl 3:1550-4.

(38) Jensen TK, Joffe M, Scheike T, Skytthe A, Gaist D, Petersen I, Christensen K. Early exposure to smoking and future fecundity among Danish twins. *Int J Androl* 2006;29(6):603-13.

(39) Storgaard L, Bonde JP, Ernst E, Spanô M, Andersen CY, Frydenberg M, Olsen J. Does smoking during pregnancy affect sons' sperm counts?. *Epidemiology* 2003;14(3):278-86.

(40) Ramlau-Hansen CH, Thulstrup AM, Storgaard L, Toft G, Olsen J, Bonde JP. Is prenatal exposure to tobacco smoking a cause of poor semen quality? A follow-up study. *Am J Epidemiol* 2007;165(12):1372-9.

(41) Coutts SM, Fulton N, Anderson RA. Environmental toxicant-induced germ cell apoptosis in the human fetal testis. *Hum Reprod* 2007;22(11):2912-8.

(42) Jensen MS, Mabeck LM, Toft G, Thulstrup AM, Bonde JP. Lower sperm counts following prenatal tobacco exposure. *Hum Reprod* 2005;20(9):2559-66.

(43) Pacifici R, Altieri I, Gandini L, Lenzi A, Passa AR, Pichini S, Rosa M, Zuccaro P, Dondero F. Environmental tobacco smoke: nicotine and cotinine concentration in semen. *Environ Res* 1995;68(1):69-72.

(44) Kumosani TA, Elshal MF, Al-Jonaid AA, Abduljabar HS. The influence of smoking on semen quality, seminal microelements and Ca²⁺-ATPase activity among infertile and fertile men. *Clin Biochem* 2008;41(14-15):1199-203.

(45) Mattison DR, Shiromizu K, Nightingale MS. Oocyte destruction by polycyclic aromatic hydrocarbon. *Am. J. Industrial Med* 1983; 4, 191-202.

(46) Belcheva A, Ivanova-Kicheva M, Tzvetkova P, Marinov M. Effects of cigarette smoking on sperm plasma membrane integrity and DNA fragmentation. *Int J Androl* 2004;27(5):296-300.

(47) Collodel G, Capitani S, Pammolli A, Giannerini V, Geminiani M, Moretti E. Semen quality of male idiopathic infertile smokers and nonsmokers: an ultrastructural study. *J Androl* 2010;31(2):108-13. Epub 2009 Sep 10.

(48) Elshal MF, El-Sayed IH, Elsaied MA, El-Masry SA, Kumosani TA. Sperm head defects and disturbances in spermatozoal chromatin and DNA integrities in idiopathic infertile subjects: Association with cigarette smoking. *Clin Biochem* 2009;42(7-8):589-94.

(49) Pacifici R, Altieri I, Gandini L, Lenzi A, Pichini S, Rosa M, Zuccaro P, Dondero F. Nicotine, cotinine, and trans-3-hydroxycotinine levels in seminal plasma of smokers: effects on sperm parameters. *Ther Drug Monit* 1993;15(5):358-63.

(50) Merino G, Lira SC, Martínez-Chéquer JC. Effects of cigarette smoking on semen characteristics of a population in Mexico. *Arch Androl* 1998;41(1):11-5.

(51) Handelsman DJ, Conway AJ, Boylan LM, Turtle JR. Testicular function in potential sperm donors: normal ranges and the effects of smoking and varicocele. *Int J Androl* 1984;7(5):369-82.

(52) Close CE, Roberts PL, Berger RE. Cigarettes, alcohol and marijuana are related to pyospermia in infertile men. *J Urol* 1990;144(4):900-3.

(53) Pasqualotto FF, Lucon AM, Sobreiro BP, Pasqualotto EB, Arap S. Effects of medical therapy, alcohol, smoking, and endocrine disruptors on male infertility. *Rev Hosp Clin Fac Med Sao Paulo* 2004;59(6):375-82.

(54) Guzick DS, Overstreet JW, Factor-Litvak P, Brazil CK, Nakajima ST, Coutifaris C, et al. Sperm morphology, motility, and concentration in fertile and infertile men. *N Engl J Med* 2001;345(19):1388-93.

(55) Chia SE, Xu B, Ong CN, Tsakok FM, Lee ST. Effect of cadmium and cigarette smoking on human semen quality. *Int J Fertil Menopausal Stud* 1994;39(5):292-8.

(56) Shi Q, Ko E, Barclay L, Hoang T, Rademaker A, Martin R. Cigarette smoking and aneuploidy in human sperm. *Mol Reprod Dev* 2001;59(4):417-21.

(57) Epstein CJ. Mechanisms of the effects of aneuploidy in mammals. *Annu Ver Genet* 1998;22:51-75

(58) Wyrobek AJ. Methods and concepts in detecting abnormal reproductive outcomes of paternal origin. *J Reprod Toxicol* 1993;7:3-16.

(59) Dellarco VL, Mavournin KH, Waters MD. Aneuploidy data review committee: summary compilation of chemical data base and evaluation of test methodology. *Matut Res* 1986;167:149-169.

(60) Rubes J, Lowe X, Moore D 2nd, Perreault S, Slott V, Evenson D, et al. Smoking cigarettes is associated with increased sperm disomy in teenage men. *Fertil Steril* 1998;70(4):715-23.

(61) Robbins WA, Vine MF, Truong KY, Eversen RB. Use of fluorescence in situ hybridization (FISH) to assess effects of smoking, caffeine, and alcohol on aneuploidy load in sperm of healthy men. *Environ Mol Mutagen* 1997; 30:175-183

(62) Trummer H, Habermann H, Haas J, Pummer K. The impact of cigarette smoking on human semen parameters and hormones. *Hum Reprod* 2002;17(6):1554-9.

(63) Vermes I., Haanen C., Steffens-Nikken H. A novel assay for apoptosis: flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescence labeled annexin V. *Journal Immunological Methods* 1995;184,39–52.

(64) Fraga CG, Motchnik PA, Wyrobek AJ, Rempel DM, Ames BN. Smoking and low antioxidant levels increase oxidative damage to sperm DNA. *Mutat Res* 1996 13;351(2):199-203.

(65) Hughes C. M., McKelvey-Martin V. J., Lewis S. E.. Human sperm DNA integrity assessed by the Comet and ELISA assays. *Mutagenesis* 14 1999; 71–75.

(66) Vine MF, Setzer RW Jr, Everson RB, Wyrobek AJ. Human sperm morphometry and smoking, caffeine, and alcohol consumption. *Reprod Toxicol* 1997;11(2-3):179-84.

(67) Sofikitis N, Takenaka M, Kanakas N, Papadopoulos H, Yamamoto Y, Drakakis P, Miyagawa I. Effects of cotinine on sperm motility, membrane function, and fertilizing capacity in vitro. *Urol Res* 2000;28(6):370-5.

- (68) Yamamoto Y, Isoyama E, Sofikitis N, Miyagawa I. Effects of smoking on testicular function and fertilizing potential in rats. *Urol Res* 1998;26(1):45-8.
- (69) Vine MF, Margolin BH, Morrison HI, Hulka BS. Cigarette smoking and sperm density: a meta-analysis. *Fertil Steril* 1994;61(1):35-43.
- (70) Holzki G, Gall H, Hermann J. Cigarette smoking and sperm quality. *Andrologia* 1991;23(2):141-4.
- (71) Mostafa T, Tawadrous G, Roaia MM, Amer MK, Kader RA, Aziz A. Effect of smoking on seminal plasma ascorbic acid in fertile and fertile males. *Andrologia* 2006;38(6):221-4.
- (72) Smoking and Health Now, Report of the Royal College of Physicians. London: Pitman Medical and Scientific Co. Ltd., 1971.
- (73) Wagner MS, Wajner SM, Maia AL. The role of thyroid hormone in testicular development and function. *J Endocrinol* 2008;199(3):351-65.
- (74) Utiger RD. Effects of smoking on thyroid function. *European Journal of Endocrinology* 1998;138:368–369.
- (75) Fisher CL, Mannino DM, Herman WH, Frumkin H. Cigarette smoking and thyroid hormone levels in males. *Int J Epidemiol* 1997;26(5):972-7.
- (76) Fukayama H, Nasu M, Murakami S, Sugawara M. Examination of antithyroid effects of smoking products in cultured thyroid follicles: only thiocyanate is a potent antithyroid agent. *Acta Endocrinol (Copenh)* 1992;127(6):520-5.
- (77) Sugawara M, Park DL, Hershman JM. Antithyroid effect of 2,3-dihydroxypyridine in vivo and in vitro. *Proc Soc Exp Biol Med* 1982;170(4):431-5.
- (78) Seyler LE Jr, Pomerleau OF, Fertig JB, Hunt D, Parker K. Pituitary hormone response to cigarette smoking. *Pharmacol Biochem Behav* 1986;24(1):159-62.

- (79) Wilkins JN, Carlson HE, Van Vunakis H, Hill MA, Gritz E, Jarvik ME. Nicotine from cigarette smoking increases circulating levels of cortisol, growth hormone, and prolactin in male chronic smokers. *Psychopharmacology (Berl)* 1982;78(4):305-8.
- (80) Fuxe K, Andersson K, Eneroth P, Härfstrand A, Agnati LF. Neuroendocrine actions of nicotine and of exposure to cigarette smoke: medical implications. *Psychoneuroendocrinology* 1989;14(1-2):19-41.
- (81) English KM, Pugh PJ, Parry H, Scutt NE, Channer KS, Jones TH. Effect of cigarette smoking on levels of bioavailable testosterone in healthy men. *Clin Sci (Lond)* 2001;100(6):661-5.
- (82) Dai WS, Gutai JP, Kuller LH, Cauley JA. Cigarette smoking and serum sex hormones in men. *Am J Epidemiol* 1988;128(4):796-805.
- (83) Rodriguez-Rigau LJ, Smith KD, Steinberger E. Cigarette smoking and semen quality. *Fertil Steril* 1982;38(1):115-6.
- (84) Ahmadnia H, Ghanbari M, Moradi MR, Khaje-Dalouee M. Effect of cigarette smoke on spermatogenesis in rats. *Urol J* 2007;4(3):159-63.
- (85) Zavos PM, Correa JR, Antypas S, Zarmakoupis-Zavos PN, Zarmakoupis CN. Effects of seminal plasma from cigarette smokers on sperm viability and longevity. *Fertil Steril* 1998;69(3):425-9.
- (86) Rajpurkar A, Jiang Y, Dhabuwala CB, Dunbar JC, Li H. Cigarette smoking induces apoptosis in rat testis. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 2002;21(3):243-8.
- (87) Gossain VV, Sherma NK, Srivastava L, Michelakis AM, Rovner DR. Hormonal effects of smoking--II: Effects on plasma cortisol, growth hormone, and prolactin. *Am J Med Sci* 1986;291(5):325-7.

(88) Kapawa A, Giannakis D, Tsoukanelis K, Kanakas N, Baltogiannis D, Agapitos E, Loutradis D, Miyagawa I, Sofikitis N. Effects of paternal cigarette smoking on testicular function, sperm fertilizing capacity, embryonic development, and blastocyst capacity for implantation in rats. *Andrologia* 2004;36(2):57-68.

(89) Yauk CL, Berndt ML, Williams A, Rowan-Carroll A, Douglas GR, Stämpfli MR. Mainstream tobacco smoke causes paternal germ-line DNA mutation. *Cancer Res* 2007;67(11):5103-6.

(90) Sorahan T, McKinney PA, Mann JR, Lancashire RJ, Stiller CA, Birch JM, et al. Childhood cancer and parental use of tobacco: findings from the inter-regional epidemiological study of childhood cancer (IRESCC). *Br J Cancer* 2001;84(1):141-6.

(91) Yardimci S, Atan A, Delibasi T, Sunguroglu K, Güven MC. Long-term effects of cigarette-smoke exposure on plasma testosterone, luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone levels in male rats. *Br J Urol* 1997;79(1):66-9.

(92) Collin O, Kilter S, Bergh A. Tobacco smoke disrupts testicular microcirculation in the rat. *Int J Androl* 1995;18(3):141-5.

(93) Güven MC, Can B, Ergün A, Saran Y, Aydos K. Ultrastructural effects of cigarette smoke on rat testis. *Eur Urol* 1999;36(6):645-9.