

Andrología

Alterações no Espermograma em Casais Inférteis Portugueses

Alterations in the Spermogram in Portuguese Infertile Couples

Sérgio Gama ^(1,2), Elísio Costa ⁽³⁾, Marta Rego ⁽¹⁾

⁽¹⁾Serviço de Química Clínica do Centro Hospitalar do Porto, EPE (Hospital Geral de Santo António), Porto, Portugal. ⁽²⁾Escola Superior de Saúde do Instituto Politécnico de Bragança, Bragança, Portugal. ⁽³⁾Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Católica Portuguesa, Porto, Portugal.

Serviço de Química Clínica do Centro Hospitalar do Porto, EPE (Hospital Geral de Santo António. Porto - Portugal.

Resumo

A infertilidade é definida como a incapacidade para atingir a gravidez após um ano de relações sexuais desprotegidas. Estudos efectuados estimam que cerca de 15% dos casais poderão apresentar problemas para conseguir conceber um filho e que um factor masculino poderá ser identificado em cerca de metade dos casos. Durante o período de um ano, foram realizados 150 espermogramas relativos a casais que acorreram à consulta de ginecologia do Centro Hospitalar do Porto, EPE (Hospital Geral de Santo António) e que apresentavam problemas de fertilidade. Em todos os espermogramas foram efectuadas as seguintes determinações: volume, liquefacção, viscosidade, concentração e número total de espermatozóides, concentração de leucócitos, presença de aglutinação, vitalidade, mobilidade, morfologia e pH. Foram considerados como valores normais os estabelecidos pela Organização Mundial de Saúde (OMS). A média de idades dos homens estudados foi de 34 anos. Dos 150 espermogramas efectuados, verificou-se que as alterações mais frequentes foram a teratozoospermia (99,3%), astenozoospermia (57,9%) e concentração de espermatozóides diminuída (32,7%). Encontrou-se correlação estatisticamente significativa ($p < 0,001$) entre os parâmetros: concentração e número total de espermatozóides, mobilidade (rápida e útil) e morfologia. Não foi encontrada correlação estatisticamente significativa entre a idade e os parâmetros laboratoriais avaliados. Este é o primeiro estudo realizado em Portugal que faz uma análise dos parâmetros seminais associados à infertilidade conjugal. Este estudo vem alertar para a necessidade de se realizarem estudos em Portugal

Correspondência: Dr. Elísio Costa
Instituto de Ciências da Saúde .
Universidade Católica Portuguesa
Campus da Asprela
Rua Dr. António Bernardino de Almeida
4200-072 Porto.
Email: ecosta@ics.porto.ucp.pt
Apoios recebidos: Nenhum apoio recebido.

mais abrangentes e que incluam homens previamente definidos como férteis ou potencialmente inférteis (após exclusão de factores femininos) de forma a contribuir para o estudo da problemática da infertilidade a nível nacional, bem como para a definição de valores de referência ajustados à nossa população, à semelhança do que vem acontecendo noutros países, tal como recomenda a OMS.

Palavras-chave: Infertilidade conjugal. Infertilidade masculina. Espermograma. Líquido seminal. Espermatozóide.

Summary

Infertility is defined as one year of unprotected intercourse without achieving pregnancy. Studies suggest that 15% of couples may have problems to concept one son and one male factor can be identified in about half of the cases. During one year period, we analyzed the ejaculates of 150 couples, attending to the Gynecology Department of Centro Hospitalar do Porto, EPE (Hospital Geral de Santo António) who present fertility problems. Volume, liquefaction, viscosity, sperm concentration, total sperm count, leukocytes, agglutination, vitality, motility, morphology and pH were performed. The average age of the participants was 34 years. From the 150 sperm analyses performed, we found that the most frequent alterations, considering the World Health Organization (WHO) reference values, were teratozoospermia (99,3%), asthenozoospermia (57,9%) and sperm concentration decreased (32,7%). A significant statistical correlation ($p < 0,001$) was observed between sperm concentration, total sperm count, motility and morphology. We didn't find significant statistical correlation between age and the studied laboratory parameters. This is the first Portuguese study that analysis the seminal parameters associated with conjugal infertility. Our study highlights the necessity to perform more extensive Portuguese studies, which include men previously classified as fertile or potentially infertile (before women factors exclusion), contributing for the study of this problematic on national level as well as for the determination of reference values adjusted to our population, such as achieved in other countries and recommended by the WHO.

Key Words: Conjugal infertility. Men infertility. Seminal analysis. Semen. Spermatozoa.

INTRODUÇÃO

A infertilidade é definida como a incapacidade para atingir a gravidez após um ano de relações sexuais desprotegidas (1-4). Estudos efectuados estimam que cerca de 15% dos casais poderão apresentar dificuldades para conseguir conceber um filho (2-7) e que um factor masculino poderá ser identificado em cerca de metade dos casos (2,4,7).

O estudo da fertilidade conjugal implica a avaliação simultânea do factor feminino e masculino (2,5,8). A duração da infertilidade é um importante factor prognóstico e, em casais com historial de infertilidade superior a 48 meses (aproximadamente 5% dos casais), a possibilidade de alcançarem uma gravidez espontânea é muito reduzida (9). Por outro lado, é reconhecido que o potencial fértil de uma mulher decresce de forma mais acentuada após os 35 anos de idade (8-10).

A avaliação da fertilidade masculina deve considerar a história clínica, o exame físico e a análise do espermograma (2,5,7,8). A análise básica de sêmen de-

verá ser realizada com base nas orientações da Organização Mundial de Saúde (OMS) e da Sociedade Europeia de Reprodução Humana e Embriologia (ESHRE). Esta análise é efectuada no ejaculado obtido por masturbação e consiste na avaliação de um conjunto de características macroscópicas, microscópicas e bioquímicas (1,11).

Certos casos de infertilidade masculina devem-se a anomalias anatómicas do tracto reprodutivo (varicoceles ou obstrução dos vasos deferentes) (3,5,7,12). Além destas podemos encontrar patologias histológicas testiculares que poderão provocar deficiências na produção de esperma e que poderão ir desde a ausência total de células germinativas a hipoespermatogénese ou anomalias na maturação espermática (12). Os varicoceles constituem a causa de infertilidade masculina mais frequentemente identificável (5). Outros casos poderão estar associados a distúrbios endócrinos (3,12), factores ambientais e/ou nutricionais (3).

Mesmo sendo possível identificar a anomalia espermática existente, cerca de 50% dos casos de infertilidade masculina permanecem inexplicáveis. No entanto, aumentam as evidências de que uma grande

parte dos casos de infertilidade ideopática estará associada a anomalias genéticas (7,12,13).

Um estudo recente sugere que os valores médios dos parâmetros seminais são significativamente mais elevados em homens férteis comparativamente com homens inférteis (14). Neste mesmo estudo, um grupo de homens, alvo de estudos de fertilidade (não confirmados como férteis ou inférteis) revelou valores seminais médios reduzidos em relação a homens férteis, sendo contudo significativamente mais elevados em comparação com homens inférteis (14).

O objectivo deste trabalho é avaliar a prevalência de alterações no espermograma de casais inférteis Portugueses.

MATERIAL E MÉTODOS

População em estudo

Durante o período de um ano (Outubro de 2006 a Outubro de 2007), foram realizados 150 espermogramas relativos a casais que acorreram à consulta de ginecologia do Centro Hospitalar do Porto, EPE (CHP) - Hospital Geral de Santo António, e que apresentavam incapacidade para atingir uma gravidez após um ano de relações sexuais desprotegidas.

Análises Seminais

Todas as amostras de sémen foram colhidas no laboratório de Química Clínica do CHP, por masturbação, após 3 a 5 dias de abstinência sexual. Uma vez colhidas, as amostras foram mantidas a 37° C durante 30 minutos antes do seu processamento. Em todos os espermogramas foram efectuadas as seguintes determinações: volume, liquefacção, viscosidade, concentração e número total de espermatozóides, concentração de leucócitos, presença de aglutinação, vitalidade, mobilidade, morfologia e pH.

Todos os parâmetros seminais foram determinados por um profissional experiente e com formação específica, de acordo com os procedimentos standard estabelecidos no manual da OMS, WHO laboratory manual for examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction - 1999 (1) e a monografia da ESHRE, Manual on Basic Semen Analysis - 2002 (11).

O volume das amostras seminais foi determinado utilizando uma pipeta graduada de escoamento total, de 2, 5 ou 10 ml. O pH foi determinado aos 30 minutos, com fita medidora de pH entre 6,0 e 10,0.

A mobilidade espermática foi determinada 30 mi-

nutos após a colheita, a 37°C, em pelo menos duas preparações a fresco, utilizando 10 µl de amostra entre lâmina e lamela de 22x22 mm. As preparações foram observadas em contraste de fase, com uma ampliação de 400x (Olympus Corporation, New York, USA) e em cada uma foram contados 100 espermatozóides na zona central. O resultado final foi obtido pelo cálculo da média aritmética entre duas contagens com diferenças não significativas. A mobilidade de cada espermatozóide foi classificada em grau a (mobilidade progressiva rápida: $\geq 25 \mu\text{m/s}$), grau b (mobilidade progressiva lenta: $5 - 25 \mu\text{m/s}$), grau c (mobilidade não progressiva: $< 5 \mu\text{m/s}$) e grau d (imobilidade). A mobilidade útil foi definida como o grau a + grau b.

A determinação da vitalidade foi realizada utilizando a coloração de eosina-nigrosina, tendo sido avaliados pelo menos 200 espermatozóides, com uma ampliação de 1000x.

A concentração de espermatozóides foi determinada utilizando câmara de Neubauer modificada, sendo as contagens efectuadas com uma ampliação de 400x e em contraste de fase.

Para avaliar a morfologia espermática foram utilizados dois esfregaços corados por Papanicolau e observados com ampliação de 1000x. Foram avaliados 400 espermatozóides em cada amostra, excepto em casos de concentração muito baixa e classificados segundo os critérios estritos de Tygerberg (15).

Classificação das alterações

Volume - hipoespermia: $< 2,0 \text{ ml}$; Liquefacção - incompleta: não liquefaz até aos 60 minutos; Viscosidade - aumentada; Concentração de espermatozóides - oligozoospermia: $< 20 \times 10^6/\text{ml}$, azoospermia: ausência de espermatozóides no ejaculado; Número total de espermatozóides - diminuído: $< 40 \times 10^6/\text{ejaculado}$; Concentração de leucócitos - leucocitoespermia: $1 \times 10^6 \text{ leucócitos/ml}$; Aglutinação - com aglutinação: apresenta aglutinação. Vitalidade - diminuída: $< 50\%$; Mobilidade - astenozoospermia: mobilidade rápida $< 25\%$ e mobilidade útil $< 50\%$; Morfologia - teratozoospermia: 14% com morfologia normal; pH - diminuído: $< 7,2$;

Análise Estatística

A análise estatística foi efectuada no programa Statistical Programs for the Social Sciences (versão 14.0; SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Foram calculados parâmetros de estatística descritiva tais como média, mediana, máximo, mínimo e frequências relati-

vas. Foi utilizada a correlação de Spearman para avaliar a relação entre os diferentes parâmetros laboratoriais. A significância foi definida por $p < 0,05$.

RESULTADOS

A média de idades da população em estudo foi de 34 anos, variando entre os 20 e os 55 anos. Os resultados dos parâmetros seminais são apresentados na tabela 1.

Tabela 1

Análises seminais da população em estudo (n=150)

	Média	Mediana	Intervalo	Nom
Idade	34	33	20-55	
Volume (ml)	3,2	3,0	0,5-8,6	2,0
Concentração (x10 ⁶ /ml)	75,3	51,7	0,1-630	20
Nº total (x10 ⁶ /ejaculado)	206,1	133,4	0,3-1539	40
Leucócitos (x10 ⁶ /ml)	0,4	0	0-20	< 1,0
Vitalidade (%)	65,2	68	12-91	50
Mobilidade rápida (%)	20,1	19	0-65	25
Mobilidade útil (%)	39,0	41,5	2-75	50
Morfologia (%)	3,8	4	0-17	> 14*
pH	8,3	8,3	6,8-9,3	7,2

(Norm) Valores normais - baseados no manual da OMS - 1999 (1).
* Valor de referência definido para os critérios de Tygerberg (15).

Verificou-se que os valores médios de volume, concentração, número total de espermatozoides, leucócitos, vitalidade e pH se apresentam normais em relação aos valores de referência definidos pela OMS (1). No entanto, os valores médios para mobilidade (rápida e útil) e morfologia encontram-se alterados na nossa população.

As alterações mais frequentemente encontradas na nossa população foram a teratozoospermia (99,3%), astenozoospermia (57,9%) e concentração de espermatozoides diminuída (32,7%, dos quais 26% oligozoospermia e 6,7% azoospermia), tal como expõe a tabela 2. As alterações menos frequentes foram a redução de pH (0,7%), existência de aglutinação (0,7%) e liquefacção incompleta (0%).

Foi observada uma correlação estatisticamente significativa ($p < 0,001$) entre a concentração, número total de espermatozoides, mobilidade (rápida e útil) e morfologia (fig.1). Não foi encontrada correlação estatisticamente significativa entre a idade e quaisquer dos restantes parâmetros laboratoriais avaliados.

DISCUSSÃO

A maioria dos estudos efectuados até hoje foi realizada utilizando homens previamente classificados como férteis ou inférteis. No entanto, o nosso estudo incidiu na análise de amostras seminais provenientes de casais inférteis, onde provavelmente poderão coexistir as duas populações, o que de certa forma dificulta a comparação dos resultados.

A literatura apresenta grandes variações nos resultados obtidos para a maioria dos parâmetros seminais, o que está de acordo com os resultados obtidos no nosso estudo.

Tabela 2

Alterações no espermograma encontradas na população em estudo

	Vol	Liq	Visc	CE	NTE	Leuc	Aglut	Vital	MR	MU	Morf	pH
Alterados n	31	0	12	49	43	10	1	21	90	103	139	1
%	20,7%	0,0%	8,0%	32,7%	28,7%	7,1%	0,7%	15,0%	64,3%	73,6%	99,3%	0,7%
Total (n)	150	150	150	150	150	140	140	140	140	140	140	150

(**Vol**) Volume. (**Liq**) Liquefacção. (**Visc**) Viscosidade. (**CE**) Concentração de espermatozoides por ml (dos quais 39 (26%) oligozoospermia e 10 (6,7%) azoospermia). (**NTE**) Número total de espermatozoides. (**Leuc**) Concentração de leucócitos. (**Aglut**) Aglutinação. (**Vital**) Vitalidade. (**MR**) Mobilidade rápida (dos quais 81 (57,9%) astenozoospermia). (**MU**) Mobilidade útil. (**Morf**) Morfologia. (**pH**) pH.

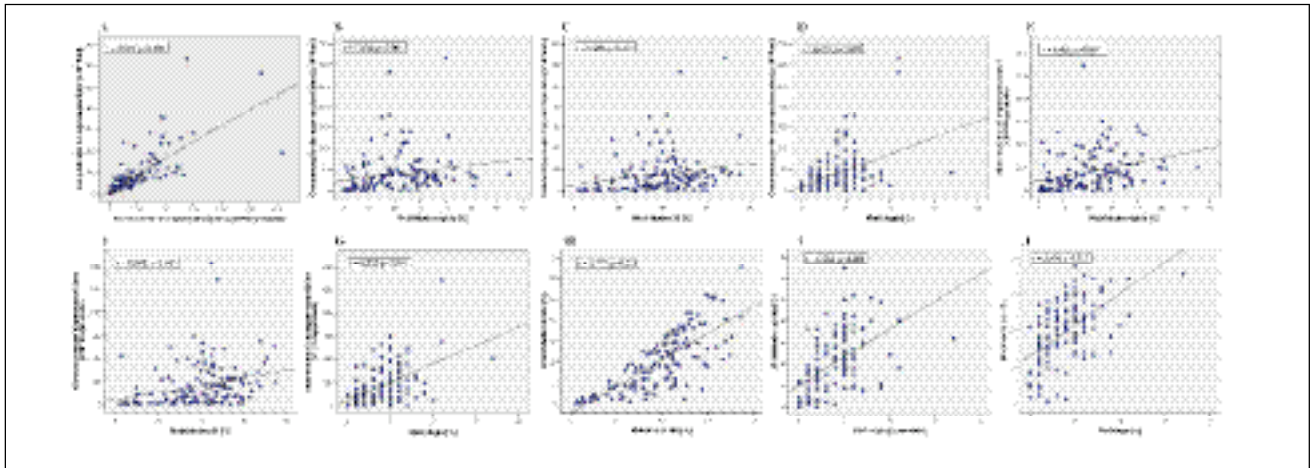


Figura 1

Correlação estatisticamente significativa ($p < 0,001$) entre os parâmetros: concentração de espermatozoides (CE), número total de espermatozoides (NTE), mobilidade rápida (MR), mobilidade útil (MU) e morfologia (Morf). (A-D) Concentração de espermatozoides Vs NTE, MR, MU e Morf. (E-G) Número total de espermatozoides Vs MR, MU e Morf. (H-I) Mobilidade rápida Vs MU e Morf. (J) Mobilidade útil Vs Morf.

Tabela 3

Estudos realizados com homens inférteis

Parâmetros seminais	Nallella et al. 2006 (n=166)		Omblet et al. 1997 (n=136)		Gunalp et al. 2001 (n=62)		Menkveld et al. 2001 (n=103)	
	Média	Intervalo	Média	Intervalo	Média	Intervalo	Média	Intervalo
Idade (anos)	-	-	30,6	-	31,3	-	33,7	-
Volume (ml)	-	-	3,1	0,5-7,1	3,2	0,5-6,5	3,59	-
Concentração ($\times 10^6/\text{ml}$)	21,3	-	32,9	0,1-141	42,3	1-109,9	18,97	0,3-130
Nº total ($\times 10^6/\text{ejaculado}$)	-	-	103,9	0,4-550,8	-	-	-	-
Vitalidade (%)	-	-	-	-	-	-	-	-
Mobilidade rápida (%)	-	-	12,2	0-57	-	-	-	-
Mobilidade útil (%)	37,0	-	6,6	0-20	10,1	0-32	3	0-12

Os valores médios de volume, concentração e número total de espermatozoides, na nossa população encontram-se dentro dos intervalos de normalidade definidos pela OMS, o que está em consonância com outros estudos efectuados, tanto em homens férteis como inférteis (14,16,17,19-21). Este facto sugere que estes parâmetros não serão a principal causa de infertilidade.

O valor médio de vitalidade revelou-se normal na nossa população. Por outro lado, a mobilidade (rápida e útil) revelou um valor médio alterado. Para homens férteis foram descritos valores médios quer normais quer alterados para a vitalidade (19,20) e mobilidade (14,16,17,19-21). Estas ambiguidades da literatura dificultam a definição da importância destes parâmetros como causas de infertilidade masculina.

Em relação à morfologia, a nossa população apre-

sentou um valor médio de 3,8% de espermatozoides normais. Os diferentes estudos referem valores médios entre 3 e 10,1% em homens inférteis (14,16-18) e entre 6,5 e 14,9% em indivíduos férteis (14,16-19,21). A nossa população apresentou um valor médio reduzido em relação aos estudos efectuados em homens férteis (14,16-19,21) apresentando-se, contudo, próximo do valor médio referido em homens inférteis por Menkveld et al. (18). A quase totalidade destes estudos referiu valores médios inferiores ao valor de referência (15), independentemente da população estudada (14,16,18,19,21). Assim, vários estudos alertam para a necessidade dos valores de referência relativos à morfologia dos espermatozoides serem revistos (14,18,19,21). O nosso estudo vem, de alguma forma, corroborar estas opiniões.

O grupo de Nallella et al. (14) determinou os parâ-

Tabela 4

Estudos realizados com homens férteis

Parâmetros seminais	Nallella et al. 2006 (n=56)		Omblet et al. 1997 (n=144)		Gunalp et al. 2001 (n=61)		Menkveld et al. 2001 (n=107)		Crazzolara et al. 2007 (n=34)		Chia et al. 1998 (n=243)		Haugen et al. 2006 (n=82)	
	Média	Intervalo	Média	Intervalo	Média	Intervalo	Média	Intervalo	Média	Intervalo	Média	Intervalo	Média	Intervalo
Idade (anos)	-	30,5	-	29,9	-	29,9	33,8	-	34	20-60	33,2	-	31	20-45
Volume (ml)	-	3,1	0,5-12,7	4,0	1-10	3,56	-	2,6	0,5-5,8	2,36	0,2-8,7	3,9	0,7-7,6	
Concentração (x10 ⁶ /ml)	69,9	53,1	1-215	50,4	6-132	81,07	1,3-230	60	1-224	44,7	1,6-433	94	0,9-326	
Nº total (x10 ⁶ /ejaculado)	-	149,5	1,7-545,3	-	-	-	-	160	1-636	-	-	355,8	2,5-1380	
Vitalidade (%)	-	-	-	-	-	-	-	47	20-67	73,6	24-98	-	-	
Mobilidade rápida (%)	-	16,9	0-57	-	-	-	-	36	11-61	-	-	34,8	10-67	
Mobilidade útil (%)	72,5	-	-	49,1	8-83	-	-	42	15-66	54,8	6-90	53,6	29-72	
Morfologia (%)	13,8	12	1-27	14,9	2-30	6,5	1-19	8	1-17	-	-	13,9	2-34	

metros seminais numa população de homens que se encontravam em avaliação de fertilidade (não confirmados como férteis ou inférteis), verificando um valor médio de concentração de espermatozoides no intervalo de normalidade definido pela OMS (32,9 x 10⁶/ml) e um valor médio de mobilidade e morfologia abaixo dos valores de referência (49,3% e 5,65%, respectivamente). Este facto é concordante com o nosso estudo.

O decréscimo dos valores médios de mobilidade e morfologia, resultante da elevada percentagem de homens da nossa população com alterações nestes parâmetros, poderá dever-se e uma maior incidência de homens inférteis na nossa população do que o que seria esperado, atendendo às percentagens descritas para a contri buição do factor masculino em casais inférteis (cerca de 50%) (2,4,7). A realização deste estudo num hospital central poderá justificar esta situação, dado que, pela maneira como está organizado o sistema de saúde em Portugal, os casais com problemas de fertilidade tendem a deslocar-se primeiro ao centro de saúde onde podem receber acompanhamento a esse nível. Estima-se que, em Portugal, mais de 50% dos casais inférteis fazem a primeira consulta no seu médico de família (8). Portanto, não sabemos até que ponto perante um casal com problemas de fertilidade, se procederá inicialmente ao estudo isolado do factor feminino em detrimento da avaliação simultânea de ambos os parceiros. Este procedimento poderá originar o tratamento com sucesso de alguns casos que apresentam apenas problemas femininos, sendo os casos mais complicados enviados para estudo num hospital central. Desta forma, num hospital central verificar-se-ia um aumento da incidência de casos de infertilidade devidos ao factor masculino isoladamente ou em conjunto com factor feminino e uma menor incidência de problemas femininos isoladamente, quando em comparação com a população em geral.

Em contraste com os estudos de Eskenazi et al. (22) e de Levitas et al. (23), não foi encontrada correlação estatisticamente significativa entre a idade e alteração nos parâmetros seminais. Este facto poderá estar relacionado com as características da população estudada, uma vez que a média de idades é de 34 anos e apenas 4 homens apresentam mais de 45 anos. O grupo de Hellstrom et al. (24) identificou decréscimos significativos no volume, mobilidade e morfologia espermática em homens com mais de 45 anos.

A discrepância verificada entre os valores obtidos nos estudos que analisamos poderá ainda, em parte, ser consequência de variações regionais do sêmen, tal como tem vindo a ser comprovado por vários investigadores na Europa (25) e Estados Unidos (26,27). Por

outro lado, a análise de determinados parâmetros do líquido seminal é revestida de um forte carácter subjectivo, variando de investigador para investigador (28-30), o que faz com que seja essencial a participação em programas de controlo extemo de qualidade. As variabilidades intra e inter-laboratoriais foram já discutidas em várias publicações (28-30).

Este é o primeiro estudo realizado em Portugal que faz uma análise dos parâmetros seminais associados à infertilidade. Este estudo vem alertar para a necessidade de se realizarem estudos em Portugal mais abrangentes e que incluam homens previamente definidos como férteis ou potencialmente inférteis (após exclusão de factores femininos), de forma a contribuir para o estudo da problemática da infertilidade a nível nacional, bem como para a definição de valores de referência ajustados à nossa população, à semelhança do que vem acontecendo noutros países, tal como recomenda a OMS.

BIBLIOGRAFIA

1. **World Health Organization.**: WHO Laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction. 4th edition. Cambridge University Press: Cambridge, 1999.
2. **Shefi S, Tu rek PJ.**: Defenition and Current Evaluation of Subfertile Men. *Int Braz J Urol* 2006; 32: 385-97.
3. **Sinclar S.**: Male Infertility: Nutritional and Environmental Considerations. *Altern Med Rev* 2000; 5: 28-38.
4. **Poppe K, Glinoyer D, Tournaye H, Maniewski U, Haentjens P, Velkeniers B.**: Is systematic screening for thyroid disorders indicated in subfertile men. *Eur J Endocrinol* 2006; 154: 363-6.
5. **Kolettis PN.**: Evaluation of the Subfertile Man. *Am Fam Physician* 2003; 67(10): 2165-72.
6. **Juul S, Karmaus W, Olsen J.**: Regional differences in waiting time to pregnancy: pregnancy-based surveys from Denmark, France, Germany, Italy and Sweden. The European Infertility and Subfecundity Study Group. *Hum Reprod* 1999; 14: 1250-4.
7. **Kretser DM, Baker HWG.**: Infertility in men: recent advances and continuing controversies. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84: 3443-50.
8. **Ferraz L.**: Infertilidade conjugal. Avaliação do factor masculino. *Acta Urológica* 2006; 23(4): 87-9.
9. **Gnoth C, Godehardt E, Frank-Herrmann P, Frioll K, Tigges J, Freundl G.**: Definition and prevalence of subfertility and infertility. *Hum Reprod* 2005; 20(5): 1144-7.
10. **Hoxsey R, Rinehart JS.**: Infertility and subsequent pregnancy. *Clin Perinatol* 1997; 24: 321-42.
11. **Kvist U, Björndahl L, eds.**: Manual on Basic Semen Analysis. ESHRE Monographs. Oxford, United Kingdom: Oxford University Press; 2002.
12. **Foresta C, Moro E, Ferlin A.**: Y chromosome micro-deletions and alterations of spermatogenesis. *Endocr Rev* 2001; 22: 226-39.
13. **Martin RH.**: Cytogenetic determinants of male fertility. *Hum Reprod Update* 2008; 14(4): 379-90.
14. **Nallella KP, Sharma RK, Aziz N, Agarwal A.**: Significance of sperm characteristics in the evaluation of male infertility. *Fertil Steril* 2006; 85(3): 629-34.
15. **Menkveld R, Stander FSH, Kotze T, Kruger TF, van Zyl JA.**: The evaluation of morphological characteristics of human spermatozoa according to stricter criteria. *Hum Reprod* 1990; 5: 586-92.
16. **Ombelet W, Bosmans E, Janssen M, Cox A, Vlasselaer J, Gyselaers W, et al.**: Semen parameters in a fertile versus subfertile population: a need for change in the interpretation of semen testing. *Hum Reprod* 1997; 12: 987-93.
17. **Gunalp S, Onculoglu C, Grugan T, Kruger TK, Lombard CJ.**: A study of semen parameters with emphasis on sperm morphology in a fertile population: an attempt to develop clinical thresholds. *Hum Reprod* 2001; 16(1): 110-4.
18. **Menkveld R, Wong WY, Lombard CJ, Wetzels AMM, Thomas CMG, Merkus HM, et al.**: Semen parameters, including WHO and strict criteria morphology, in a fertile and subfertile population: an effort towards standardization of in-vivo thresholds. *Hum Reprod* 2001; 6: 1165-71.
19. **Crazolara S, Wunder D, Nägeli E, Bodmer C, Graf S, Birkhäuser, MH.**: Semen parameters in a fertile swiss population. *Swiss Med Wkly* 2007; 137: 166-72.
20. **Chia SE, Tay SK, Lim ST.**: What constitutes a normal semen analysis? Semen parameters of 243 fertile men. *Hum Reprod* 1998; 12: 3394-8.
21. **Haugen TB, Egeland T, Magnus Ø.**: Semen Parameters in Norwegian Fertile Men. *J Androl* 2006; 27: 66-71.
22. **Eskenazi B, Wyrobek AJ, Slotter E, Kidd SA, Moore L, Young S, et al.**: The association of age and semen quality in healthy men. *Hum Reprod* 2003; 18(2): 447-54.
23. **Levitas E, Lunenfeld E, Weisz N, Friger M, Potashnik G.**: Relationship between age and semen parameters in men with normal sperm concentration: analysis of 6022 semen samples. *Andrologia* 2007; 39: 45-50.
24. **Hellstrom WJG, Overstreet JW, Sikka SC, Denne J, Ahuja S, Hoover AM, et al.**: Semen and sperm reference ranges for men 45 years of age and older. *J Androl* 2006; 27(3): 421-8.
25. **Jørgensen N, Andersen AG, Eustache F, Irvine DS,**

- Suominen JSS, Petersen JH, et al.:** Regional differences in semen quality in Europe. *Hum Reprod* 2001; 16: 1012-9.
26. **Swan SH, Brazil C, Drobnis EZ, Liu F, Kruse RL, Hatch M, et al.:** Geographic Differences in Semen Quality of Fertile U.S. Males. *Environ Health Perspect* 2003; 111(4): 414-20.
27. **Swan SH.:** Semen quality in fertile US men in relation to geographical area and pesticide exposure. *Int J Androl* 2006; 29(1): 62-8.
28. **Franken DR, Smith M, Menkveld R, Kruger TF, Sekadde-Kigonde C, Mbizvo M, et al.:** The development of a continuous quality control programme for strict sperm morphology among sub-Saharan African laboratories. *Hum Reprod* 2000; 15: 667-71.
29. **Auger J, Eustache F, Ducot B, Blandin T, Daudin M, Diaz I, et al.:** Intra- and inter-individual variability in human sperm concentration, motility and vitality assessment during a work-shop involving ten laboratories. *Human Reprod* 2000; 15: 2360-8.
30. **Eustache F, Auger J.:** Inter-individual variability in the morphological assessment of human sperm: effect of the level of experience and the use of standard methods. *Hum Reprod* 2003; 5: 1018-22.