

# Infertilidade Masculina e Factores Ambientais

.....

Belmiro Parada, António Requixa, Arnaldo Figueiredo, Alfredo Mota

Serviço de Urologia e Transplantação Renal  
Director de Serviço – Professor Doutor Alfredo Mota – Hospitais da Universidade de Coimbra

**Correspondência para:** Belmiro Parada – Serviço de Urologia e Transplantação Renal – Hospitais da Universidade de Coimbra  
– Coimbra - Portugal

Telefone: (351) 919 976 379 – Fax: (351) 239 482 684 – E-mail: parada.belmiro@netc.pt

## Resumo

A infertilidade atinge cerca de 13-18% dos casais e estudos clínicos e epidemiológicos mostram uma incidência crescente do factor masculino, que está envolvido em cerca de metade dos casos.

São diversas as possíveis causas de infertilidade masculina, genéticas, endócrinas, imunológicas e ambientais. O impacto dos factores ambientais na fertilidade masculina ainda não está completamente esclarecido.

Neste artigo fazemos uma breve revisão dos potenciais tóxicos ambientais sobre a função reprodutora masculina.

**Palavras chave:** Infertilidade, infertilidade masculina, factores ambientais.

## Abstract

Infertility affects 13-18% of couples and growing evidence from clinical and epidemiological studies suggests an increasing incidence of male reproductive factors, which are involved in up to half of all cases. Potential causes of male factor infertility are many: genetic, endocrine, immunological and environmental. The impact of environmental factors on male fertility is not yet fully understood.

We make a brief review of potential toxics on male reproductive function.

**Key words:** Infertility, male infertility; environmental factors.

.....

A propagação do seu próprio genoma é uma característica de todos os organismos, sendo um princípio básico e fundamental da evolução. Uma boa capacidade reprodutora mede, por isso, a apti-

dão de uma espécie para sobreviver. Embora haja discrepância nos valores da prevalência e sejam escassos os dados fiáveis, a infertilidade afecta 13-18% dos casais<sup>1</sup>. Crê-se que o factor masculino esteja

presente em cerca de metade dos casos e estudos epidemiológicos e clínicos sugerem uma incidência crescente<sup>2</sup>. São diversas as causas potenciais de infertilidade masculina, assumindo particular relevância nos dias de hoje os factores ambientais<sup>3</sup>.

As alterações causadas pelos agentes ambientais podem incluir toxicidade reprodutiva, com alterações da fertilidade, e toxicidade no desenvolvimento do organismo, provocado pela agressão em fases diversas, desde a exposição prévia à concepção por um dos progenitores, durante o desenvolvimento pré-natal até à fase de maturação sexual. Este tipo de toxicidade não está tão bem documentado e é mais difícil de provar, mas pode levar a abortos prematuros, maior incidência de anomalias genéticas e aumento das doenças malignas na infância<sup>3</sup>.

A espermatogénese envolve a replicação contínua e uma metamorfose de células estaminais diplóides, relativamente indiferenciadas, em células haplóides, altamente especializadas, com capacidade de se moverem através do aparelho reprodutor feminino e fertilizar um óvulo – os espermatozóides. Este processo altamente complexo ocorre sob o controlo do eixo hipotálamo-hipofisário e das hormonas testiculares, susceptível à influência de outros órgãos endócrinos, nomeadamente o cérebro. Não é por isso surpreendente que, diversos agentes ambientais possam afectar de forma adversa o desenvolvimento das células germinativas masculinas, em diferentes fases e por meios diversos. Aliás, poderá explicar, em parte, o grande número de espermatozóides produzidos (cerca de  $2 \times 10^8$ /dia e  $2 \times 10^{12}$  durante a vida), quando apenas um é necessário para o processo de fecundação<sup>4</sup>.

Teoricamente, os agentes químicos podem lesar a espermatogénese em qualquer fase, desde a espermatogónia até ao espermatozóide maduro. São possíveis três efeitos tóxicos, não exclusivos entre si:

- Morte celular, por necrose ou apoptose. Estudos recentes sugerem que a indução de morte celular por apoptose é o principal mecanismo de acção de toxinas testiculares como o ácido metoxi-acético<sup>5</sup> ou de condições fisiológicas adversas como a privação de gonadotropinas<sup>6</sup>. Estudos experimentais em roedores sugerem que o sistema “Fas-Faz ligando” possa estar envolvido na apoptose induzida por toxinas<sup>7</sup>. Outros genes que podem ter um

papel neste processo são o p53, Bcl-2, Bcl-w e o Bax.

- Lesão celular sub-letal, que pode ser reparada ou deixar efeitos permanentes na estrutura ou função do espermatozóide maduro, incluindo a possibilidade de efeitos genéticos transgeracionais<sup>8</sup>.
- Alterações genéticas. A capacidade de reparação de DNA está diminuída durante o alongamento da espermatíde e é inexistente no espermatozóide<sup>4</sup>.

A função testicular, incluindo a secreção de androgénios e a produção de espermatozóides férteis, pode ser afectada adversamente por mecanismos diversos:

- Toxicidade pré-testicular – engloba perturbações na secreção fisiológica das hormonas hipofisárias FSH e LH, com a resultante falência testicular<sup>3</sup>. Inclui a exposição ocupacional a esteróides sexuais, como estrogénios, que podem inibir a secreção de gonadotropinas hipofisárias com a consequente disfunção sexual, ginecomastia e hipogonadismo hipogonadotrófico. Há referências destes efeitos lesivos em trabalhadores da indústria de contraceptivos orais ou lidando com grandes quantidades de químicos estrogénicos não esteróides<sup>9,10</sup>.
- Toxicidade testicular – a toxicidade testicular directa pode afectar os vários tipos celulares, incluindo as células de Leydig, células de Sertoli e as células germinativas. Embora os efeitos primários dos tóxicos sejam relativamente específicos de cada tipo celular, a estreita interdependência da espermatogénese e da esteroidogénese determina que as lesões sejam, na prática, pan-testiculares. Há uma sensibilidade elevada das células germinativas às radiações ionizantes e aos agentes alquilantes. As células mais sensíveis são as espermatogónias, as únicas que se desenvolvem na base das células de Sertoli, fora da barreira protectora hemato-testicular. Os vários sub-tipos de espermatogónias diferem quanto à sensibilidade às diversas citotoxinas, levando a importantes repercussões na recuperação da agressão. Por exemplo, as espermatogónias A<sub>0</sub> ou Ad (dark) não apresentam actividade proliferativa em circuns-

tâncias normais, constituindo a população estaminal germinativa. A sua destruição leva a lesão espermatogénica irreversível. Pelo contrário, as espermatogónias proliferativas Ap (pale), apesar de mais sensíveis aos agentes citotóxicos, podem ser substituídas pelas células estaminais de reserva, embora essa recuperação possa demorar alguns anos<sup>4</sup>.

- Toxicidade pós-testicular – este tipo de toxicidade é relativamente incomum. A maioria dos casos foi descoberta durante a investigação de novos contraceptivos químicos masculinos<sup>11</sup>. A estrutura neuromuscular do epididimo pode ser afectada por fármacos adrenolíticos, como a guanetidina ou a metoxamina, condicionando estase do esperma no epididimo. A secreção de fluido pelo epitélio epididimário e o transporte epididimário de espermatozoides são potenciais alvos adicionais de agentes tóxicos, podendo daí resultar uma perda completa de motilidade e consequente esterilidade<sup>12</sup>.

Existem mais de 100 000 agentes químicos e físicos referenciados pela agência norte-americana de segurança ocupacional NIOSH (National Institute of Occupational Safety)<sup>3</sup>. É interessante notar que, em mais de 95% destas substâncias, não foram estudados os efeitos sobre o aparelho reprodutor, apesar de a infertilidade estar referenciada entre as 10 principais doenças ocupacionais<sup>13</sup>.

Não é fácil o estudo da toxicologia humana e o estabelecimento de relações causa-efeito. Os dados disponíveis provêm essencialmente de duas fontes:

- Estudos observacionais humanos. Uma vez que os ensaios prospectivos em humanos não são exequíveis, dada a toxicidade dos agentes, a informação disponível provêm principalmente de estudos retrospectivos, caso-controlo e coorte, com as limitações daí decorrentes.
- Estudos experimentais em células e em modelos animais. Apesar de demonstrada uma acção tóxica de várias substâncias em modelos animais, a extrapolação para os humanos é limitada e frequentemente incorrecta, devido às diferenças da função reprodutiva e do metabolismo das diversas espécies.

Iremos abordar alguns dos agentes ambientais com possíveis repercussões na fertilidade masculina.

## 1. Agentes Físicos

### 1.1 Calor

Continua por estabelecer, de forma clara, uma relação entre a elevação da temperatura escrotal e a redução dos parâmetros seminais, apesar de serem abundantes as referências a este agente como sendo lesivo da função testicular. Já em 1941, McLeod e Hotchkiss notaram essa associação, ao verificarem que a indução de hiperpirexia em seis homens saudáveis levava a uma queda significativa na contagem de espermatozoides<sup>14</sup>. Breves períodos de calor escrotal em animais experimentais reduzem a produção de esperma e a fertilidade de forma acentuada<sup>15</sup>. A espermatogénese sub-ótima que se verifica nalguns doentes com varicocele também foi associada ao aquecimento escrotal. Há igualmente registos de diminuição da densidade do esperma nos meses de verão, em homens que trabalham no exterior<sup>16</sup>. A exposição ocupacional ao calor, tal como se verifica nos padeiros, cozinheiros, trabalhadores da indústria de cerâmica, fundições, bombeiros, também foi referida como afectando a função reprodutora de forma adversa, embora se mantenha a controvérsia<sup>17</sup>.

### 1.2 Radiações Ionizantes

Os testículos são um dos tecidos mais sensíveis do corpo humano e as radiações ionizantes são dos agentes cujos efeitos anti-espermatogénicos estão mais bem estudados nos humanos. Estudos realizados em prisioneiros americanos, voluntários, nos anos 50 e 60, incluindo espermogramas seriados e biópsias testiculares, demonstraram a lesão reversível e dependente da dose das espermatogónias proliferativas, causando oligozoospermias a partir de doses de 20 cGy e azoospermias acima de 75 cGy, com aumento dos tempos de recuperação<sup>18</sup>. As células de Leydig e de Sertoli só são lesadas com doses superiores<sup>19</sup>. Estudos subsequentes, em exposições acidentais, ocupacionais ou irradiações terapêuticas confirmaram estes dados<sup>20</sup>.

Entre as células germinativas que sobrevivem à irradiação, podemos observar lesões cromossómicas, que podem levar à morte celular ou transmissão de alterações citogenéticas. Também podem ocorrer alterações na qualidade do esperma, incluindo, para além dos já referidos, diminuição da motilidade e defeitos ultraestruturais.

Gardner e colaboradores<sup>21</sup> notaram que, os filhos de trabalhadores de uma central nuclear no Reino

Unido (Sellafield), tinham uma incidência aumentada de leucemia. Contudo, estudos subsequentes não encontraram uma relação causal entre a exposição paterna à radiação ionizante e o risco de cancro na descendência. De igual modo, as associações entre exposição paterna a radiações e abortos espontâneos ou partos prematuros, são geralmente fracas<sup>22</sup>.

### 1.3 Radiações Não Ionizantes

Postulou-se que a exposição a radiações não ionizantes, como microondas e campos electromagnéticos, pode ser a causa de diminuição da fertilidade em machos, mas os dados são controversos e actualmente não há evidência que radiações não ionizantes possam afectar adversamente a fertilidade masculina<sup>3</sup>.

Os campos electromagnéticos são gerados por equipamentos domésticos (rádio, televisão, etc...) e industriais. Sabe-se que campos de alta intensidade (> 10 Tesla) e baixa frequência (50-60 Hz) podem ser lesivos, mas a exposição ambiental normal não excede os 0,3 Tesla. Em estudos experimentais, não foi demonstrado qualquer efeito na espermatogénese.

A recente e crescente utilização de telemóveis, que podem gerar campos magnéticos de moderada intensidade e elevada frequência, constitui um motivo de preocupação. Afectam as proporções de células espermatogénicas em Hamsters<sup>23</sup> e a possibilidade de que estes campos de alta frequência possam estar associados a um aumento do cancro do testículo também foi referida<sup>24</sup>.

### 1.4 Ruídos e Vibrações

A exposição ao ruído pode ter diversos efeitos, incluindo a secreção de hormonas do córtex supra-renal, como resposta fisiológica ao stress, podendo condicionar alterações na libertação pulsátil de gonadotropinas<sup>25</sup>:

Alguns estudos referiram uma diminuição da qualidade do sémen em trabalhadores expostos a vibrações corporais, mas devido à limitação dos dados, não podem ser extraídas conclusões seguras destes estudos<sup>26</sup>.

## 2. Agentes Químicos

### 2.1 Pesticidas

O dibromocloropropano (DBCP) foi um pesticida largamente usado na década de 70, nos Estados Unidos e Israel, até à descoberta dos seus efeitos

tóxicos no sistema reprodutor masculino. Este agente causava oligozoospermias e azoospermias, com elevação dos níveis de FSH e LH, de forma irreversível nas exposições mais intensas e prolongadas<sup>27</sup>. O seu mecanismo de toxicidade não é conhecido, mas foi sugerida a produção de um metabólito que actua directamente nas células germinativas, inibindo a espermatogénese. As células de Sertoli e de Leydig são mais resistentes aos efeitos lesivos do DBCP<sup>28</sup>.

Alguns insecticidas também demonstraram induzir alterações na qualidade do líquido seminal.

É fundamental a redução do risco de exposição, com utilização de agentes mais seguros e o reforço dos cuidados na sua aplicação.

### 2.2 Metais

Numerosos registos associaram a exposição a metais pesados como chumbo, mercúrio e cádmio, à infertilidade masculina, embora frequentemente seja questionável a sua validade científica.

A intoxicação pelo chumbo levaria à diminuição da fertilidade por um efeito directo no testículo, incluindo fibrose e oligozoospermia, associada a uma acção no eixo hipotálamo-hipofisário<sup>29</sup>.

Os efeitos do cádmio foram demonstrados experimentalmente, mas para doses quase fatais para os animais, causando destruição das células germinativas e necrose testicular através de um efeito directo na circulação testicular arterial.

Na actualidade, com as medidas industriais e comunitárias para limitar a exposição a estes agentes, parecem ser reduzidos os riscos de efeitos adversos no sistema reprodutor masculino.

### 2.3 Solventes Orgânicos

Merecem especial atenção os éteres de glicol, um solvente orgânico largamente utilizado nas tintas. As células mais sensíveis à sua acção nefasta parecem ser os espermátocitos primários, embora as espermatogónias também possam ser afectadas para dosagens superiores<sup>30</sup>. Welch encontrou uma maior incidência de oligozoospermias e azoospermias em trabalhadores expostos a este agente, embora a força desta associação fosse equívoca<sup>31</sup>. Estudos em ratos sugerem que esta toxicidade é causada por dois metabólitos, ácido metoxi-acético e etoxi-acético.

O benzeno, um hidrocarboneto aromático usado como solvente nas refinarias de petróleo, causa atrofia testicular e oligoteratozoospermia em ratos<sup>32</sup>.

Em geral, as evidências relativas aos efeitos deletérios destes agentes são fracas, não se podendo tirar conclusões definitivas.

## 2.4 Estrogénios Ambientais

Foi sugerido que estrogénios ambientais representam uma ameaça para o sistema reprodutor masculino. Estes xenoestrogénios, apesar da sua acção estrogénica fraca, poderiam activar ou inibir os receptores de estrogénios endógenos, alterar a sua síntese e metabolismo, modificando a sua acção, bem como afectar a produção e actividade de enzimas esteróides<sup>33</sup>. Os dois tipos principais de xenoestrogénios são os estrogénios da dieta, encontrados em plantas e sementes contaminadas por fungos, e os estrogénios químicos sintéticos, encontrados em pesticidas, herbicidas e nos seus metabólitos (DDT, dioxinas,...).

Parece, contudo, pouco provável que estes agentes possam levar à diminuição dos parâmetros seminais na população em geral, pelo seu baixo nível de exposição.

## 2.5 Agentes Citotóxicos

Apesar da sua importância inquestionável na terapêutica oncológica, os fármacos citotóxicos têm acção directa nas células germinativas, levando à sua morte. A recuperação pode ocorrer, embora lentamente, em função da intensidade e dos agentes de quimioterapia utilizados. Além do mais, as células sobreviventes podem, teoricamente, acumular defeitos genéticos, levando à transmissão de mutações e/ou malformações, embora esse risco não se tenha verificado nos descendentes de homens submetidos a estes agentes. Importa alertar para a necessidade de criopreservação do esperma antes do início destes tratamentos<sup>4</sup>.

## 2.6 Tabaco

O tabaco contém vários compostos, alguns dos quais, como a acroleína, são tóxicos para o sistema reprodutor. A maioria dos escassos trabalhos cientificamente válidos demonstrou uma redução da motilidade dos espermatozoides entre os fumadores, mas o tabagismo não se associou a redução da fecundidade<sup>34</sup>.

Uma preocupação recente advém do reconhecimento crescente de que o tabaco pode causar lesões do DNA. As consequências daí decorrentes não são conhecidas, mas existe um risco potencial de que essas anomalias sejam transmitidas à descendência. Alguns estudos mostraram uma associação positiva entre tabagismo e a incidência de cancro nos filhos, especialmente leucemia<sup>35</sup>.

## 2.7 Dieta, Álcool, Drogas

Diversos factores dietéticos específicos influenciaram directamente o sistema reprodutor em estudos experimentais, em parte devido à inibição da secreção de LH. Contudo, há poucas evidências de que efeitos similares possam ser induzidos em humanos. Possivelmente de maior importância, seja o sinergismo entre deficiências dietéticas e toxinas ambientais.

A influência de drogas (marijuana, cocaína, opióides) na função reprodutora permanece pouco clara e difícil de estudar de forma cientificamente válida. Contudo, estes agentes parecem ter efeitos mínimos na espermatogénese, apesar de os opióides (heroína, metadona, morfina) suprimirem a secreção de LH e testosterona de forma acentuada, por inibição hipotalâmica.

A ingestão excessiva de álcool associa-se a uma toxicidade testicular directa, para além dos efeitos indirectos na doença hepática crónica e no estado de nutrição<sup>36</sup>.

## 2.8 Gases Anestésicos

Apesar de referências a alterações dos parâmetros seminais em ratos expostos a halotano e dos registos de aumento de abortos espontâneos, as características destes estudos tornam difícil estabelecer uma relação causa-efeito cientificamente válida<sup>37</sup>.

Em suma, são diversos os potenciais agentes ambientais deletérios para o sistema reprodutor masculino. Na prática clínica, a possibilidade de existência de factores ambientais tóxicos como causa de infertilidade masculina e de outras doenças andrológicas deve ser sempre considerada. A correcta identificação desses factores deve basear-se num elevado grau de suspeição, com base numa cuidadosa história clínica, com identificação de eventual exposição ocupacional, doméstica, recreacional ou ambiental. A confirmação laboratorial de formas específicas de intoxicação raramente é possível e, embora

algumas toxinas sejam doseáveis nos fluidos orgânicos, a relação causal é difícil de estabelecer. Essa identificação deve servir também para um correcto aconselhamento do casal e eventual mudança de estilo de vida.

## Bibliografia

- Iammarrone E, Balet R, Lower AM, et al. Male infertility. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2003; 17(2): 211-229.
- Brugh VM, Matschke HM, Lipshultz LI. Male factor infertility. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2003; 32(3): 689-707.
- Orejuela F, Lipshultz LI. Effects of working environment on reproductive health. *Contemp Urol* 1998; 10(3): 86-92.
- Brinkworth MH, Handelsman DJ. Environmental influences on male reproductive health. In: Nieschlag E, Behre HM. *Andrology – Male reproductive health and dysfunction*. Second Edition. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, 2000: 253-266.
- Brinkworth MH, Weinbauer GF, Schlatt S, et al. Identification of male germ cells undergoing apoptosis in adult rats. *J Reprod Fertil* 1995; 105: 25-33.
- Tapainen JS, Tilly JL, Vihko KK, et al. Hormonal control of apoptotic cell death in the testis: gonadotropins and androgens as testicular cell survival factors. *Mol Endocrinol* 1993; 7: 643-650.
- Lee J, Richburg JH, Younkin SC, et al. The Fas system is a key regulator of germ cell apoptosis in the testis. *Endocrinology* 1997; 138: 2081-2088.
- Anderson D, Edwards AJ, Brinkworth MH, et al. Male-mediated F1 effects in mice exposed to 1,3-butadiene. *Toxicology* 1996; 113: 120-127.
- Harrington JM, Stein GF, Rivera RO, et al. The occupational hazards of formulating oral contraceptives – a survey of plant employees. *Arch Environ Health* 1978; 33: 12-15.
- Finkelstein JS, McCully WF, MacLaughlin DT, et al. The mortician's mystery. Gynecomastia and reversible hypogonadotropic hypogonadism in an embalmer. *N Engl J Med* 1988; 318: 961-965.
- Cooper TG, Yeung CH. Recent biochemical approaches to post-testicular, epididimal contraception. *Hum Reprod Update* 1999; 5: 141-152.
- Wilton LJ, Temple-Smith PD, Baker HW, et al. *Fertil Steril* 1988; 49: 1052-1058.
- Gold EB, Lasley BL, Schenker MB. Introduction: rationale for an update. *Reproductive hazards. Occup Med* 1994; 9(3): 363-372.
- MacLeod J, Hotchkiss RS. The effect of hyperpyrexia upon spermatozoa counts in men. *Endocrinology* 1941; 28: 780-784.
- Bonde JP, Giwercman A. Occupational hazards to male fecundity. *Reprod Med Rev* 1995; 4: 59-73.
- Levine RJ, Bordson BL, Mathew RM, et al. Deterioration of semen quality during summer in New Orleans. *Fertil Steril* 1988; 49: 900-907.
- Tas S, Lauwerys R, Lison D. Occupational hazards for the male reproductive system. *Crit Rev Toxicol* 1996; 26(3): 261-307.
- Rowley MJ, Leach DR, Warner GA, Heller CG. Effect of graded doses of ionizing radiation on the human testis. *Radiat Res* 1974; 59: 665-678.
- Tsatsoulis A, Shalet SM, Morris ID, et al. Immunoactive inhibin as a marker of Sertoli cell function following cytotoxic damage to the human testis. *Horm Res* 1990; 34(5-6): 254-259.
- Neel JV. Reappraisal of studies concerning the genetic effects of the radiation of humans, mice, and *Drosophila*. *Environ Mol Mutagen* 1998; 31: 4-10.
- Gardner MJ, Snee MP, Hall AJ, et al. Results of case-control study of leukaemia and lymphoma among young people near Sella Field nuclear plant in West Cumbria. *BMJ* 1990; 300: 423-429.
- McDonald AD, McDonald JC, Armstrong B, et al. Father's occupation and pregnancy outcome. *Br J Int Med* 1989; 46(5): 329-333.
- Niehaus M, Bruggemeyer H, Behre HM, et al. Growth retardation, testicular stimulation and increased melatonin synthesis by weak magnetic fields (50 Hz) in Djungarian hamsters, *Phodopus sungorus*. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 234: 707-711.
- Goldsmith JR. Epidemiologic evidence relevant to radar (microwave) effects. *Environ Health Perspect* 1997; 105(Suppl 6): 1579-1587.
- Schiff M. Non-auditory effects of noise. *Trans Am Acad Ophthalmol Otolaryngol* 1973; 77(5): 384-398.
- Figa-Talamanca I, Cini C, Varricchio GC, et al. Effects of prolonged automobile driving on male reproduction function: a study among taxi drivers. *Am J Ind Med* 1996; 30: 750-758.
- Eaton M, Schenker M, Whorton MD, et al. Seven-year follow-up of workers exposed to 1,2-dibromo-3-chloropropane. *J Occup Med* 1986; 28: 1145-1150.
- Biava CG, Smuckler EA, Whorton D. The testicular morphology of individuals exposed to dibromochloropropane. *Exp Mol Pathol* 1978; 29: 448-458.
- Braunstein GD, Dahlgren J, Loriaux DL. Hypogonadism in chronically lead-exposed men. *Infertility* 1978; 1(1): 33-51.
- Oudiz D, Zenick H. In vivo and in vitro evaluation of spermatotoxicity induced by 2-ethoxy-ethanol treatment. *Toxicol Appl Pharmacol* 1986; 84: 576-583.
- Welsh LS, Schrader SM, Turner TW, et al. Effects of exposure to ethylene glycol ethers on shipyard painters II: male reproduction. *Am J Ind Med* 1988; 14: 509-526.
- Ward CO, Kuna RA, Snyder NK, et al. Sub-chronic inhalation toxicity of benzene in rats and mice. *Am J Ind Med* 1985; 7: 457-473.

33. Dunn JF, Nisula BC, Rodbard D. Transport of steroid hormones: binding of 21 endogenous steroids to both testosterone-binding globulin and corticoesteroid-binding globulin in human plasma. *J Clin Endocrinol Metab* 1981; 53(1): 58-68.
34. Bolumar F, Olsen J, Boldsen J. Smoking reduces fecundity: a European multicenter study on infertility and subfecundity. The European Study Group on Infertility and Subfecundity. *Am J Epidemiol* 1996; 143: 578-587.
35. Ji BT, Shu XO, Linet MS, et al. Paternal cigarette smoking and the risk of childhood cancer among offspring of non-smoking mothers. *J Natl Cancer Inst* 1997; 89: 238-244.
36. Pajarinen JT, Karhunen PJ. Spermatogenic arrest and Sertoli cell-only syndrome – common alcohol-induced disorders of the human testis. *Int J Androl* 1994; 17: 292-299.
37. Wyrobek AJ, Brodsky J, Gordon L, et al. Sperm studies in anesthesiologists. *Anesthesiology* 1981; 55: 527-532.