



Liliane Fabio Isidoro da Silva

**Efeito da idade do homem na avaliação do
sêmen pela motile sperm organelle
morphology examination (MSOME)**

**Orientador: José Gonçalves Franco Jr
Co-Orientador: Mário Cavagna**

Mestrado

**FACULDADE DE MEDICINA DE BOTUCATU
Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”**

UNESP

2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: *ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE*

Silva, Liliane Fabio Isidoro da.

Efeito da idade do homem na avaliação do sêmen pela motile sperm organelle morphology examination (MSOME) / Liliane Fabio Isidoro da Silva. – Botucatu : [s.n.], 2012

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: José Gonçalves Franco Jr

Coorientador: Mário Cavagna

Capes: 40101150

1. Espermatozóides. 2. Sêmen. 3. Homem – Idade. 4. Morfologia (Biologia)

Palavras-chave: Dano do DNA; Idade masculina; IMSI; MSOME; Morfologia do espermatozóide.

Dedico

Aos meus pais, José e Edilaine:
Vocês me transmitiram importantes
valores: o **R**espeito, a **H**onestidade, o
Perdão, a **P**ersistência, a **A**mizade,
e o **A**mor a minha grande família.

AMO MUITO VOCÊS!!!

OBRIGADA!!!

Ao prof. Dr. José Gonçalves Franco Jr

Algumas pessoas marcam a nossa vida para sempre, umas porque nos vão ajudando na construção, outras porque nos apresentam projetos de sonho e outras ainda porque nos desafiam a construí-los.

Obrigada pela sua orientação e ensinamentos preciosos para o meu desenvolver profissional.

Muito obrigada!!!!

Agradecimento Especial

À

Dra Claudia Petersen

Que tornou viável a conquista dos meus objetivos e sonhos, que me fortaleceu para ultrapassar os obstáculos impostos no meu caminho e, acima de tudo, muito compreensiva com minhas dificuldades. Agradeço a você pelas sugestões e correções feitas durante o trabalho, as quais contribuíram para o meu crescimento profissional. **Obrigada!**

Agradeço

Primeiramente a DEUS, por me oferecer saúde e fé.

No momento em que avanço mais um degrau na escala do saber, rendo minhas homenagens aqueles que, na dificuldade, me ajudaram a transpor os obstáculos e a atingir meus objetivos.

Ao meu orientador Prof. Dr. José Gonçalves Franco Jr e meu co-orientador Prof. Dr. Mário Cavagna, pela oportunidade de realizar este trabalho.

As minhas amigas e companheira de trabalho Fabiana Massaro, Ana Lúcia Luchesi e Cláudia Petersen, meus eternos agradecimentos pela atenção e pelos ensinamentos. Obrigada pelo apoio profissional e pessoal durante o desenvolvimento desta tese.

Ao Dr João Batista Alcântra Oliveira pelos ensinamentos de paciência, perseverança e por me ajudar durante o decorrer deste trabalho.

Aos médicos Dr Ricardo Baruffi, Dra Paula Contart, Dr Eduardo Vila Boas e Dr João Cornicelli por ajudarem de maneiras diversas durante o percorrer deste caminho.

As enfermeiras Valéria, Juliana. Andréia e as auxiliares Carol e Suelen pelo bom dia de todo dia.

As secretárias Idalga e Andressa e todos os funcionários da limpeza, manutenção e segurança pelo agradável ambiente de trabalho.

Aos funcionários da seção de pós-graduação e da biblioteca da Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP, por serem tão prestativos e me atenderem com tanta gentileza.

Aos amigos que muitas vezes não estavam presentes no dia a dia, mas nas boas horas de descontração e diversão: Manuela Pucca, Felipe Cerni, Fernanda Paschoal, Elyara Soares, Paula Payão, Carla Rongon e Plínio Renato, Gabriel Falconi e Gláucia Campos. A vocês que sempre me fortaleceram, seja com o apoio nas horas difíceis, ou mesmo, com as risadas de finais de semana.

À minha família: Aos meus pais, meu irmão Guilherme e minha cunhada Vânia, meus avós Paulino e Hermelinda e minha tia Francis, que em todos os momentos me apoiaram e me fortaleceram sempre com muito carinho e amor. Obrigada por serem peças insubstituíveis na minha vida!

Finalmente, aos pacientes que permitiram a realização deste trabalho.

Certeza!

De tudo ficaram três coisas:
A certeza de que estamos sempre começando...
A certeza de que precisamos continuar...
A certeza de que seremos interrompidos antes de
terminar...
Portanto devemos:
Fazer da interrupção um caminho novo...
Da queda um passo de dança...
Do medo uma escada...
Do sonho uma ponte...
Da procura um encontro...

(Fernando Pessoa)

Sumário

Parte I: Idade masculina: qualidade do sêmen e fertilidade

Lista de Tabelas	13
Lista de Figuras	14
Lista de Abreviaturas	15
Resumo	17
Sumamary	18
Introdução	19
A –Parâmetros seminais:	
Volume	20
Concentração	22
Motilidade	23
Morfologia	24
B – Dano no DNA espermático	26
C –Genética	28
D – Fertilidade	29
Considerações finais	32
Referências Bibliográficas	33

Parte II: The effects of male age on sperm analysis by motile sperm organelle morphology examination (MSOME)

Abstract	40
Background	41
Methods	43
Results	47
Discussion	53
References	57

Anexos

Termo de Consentimento	61
Parecer de Aprovação do CEP	66

LISTA DE TABELA

Tabela 1. Características gerais dos 3 grupos estudados	47
--	----

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Morfologia dos espermatozoides observados em alta magnificação (8450x) pelo MSOME. A: Espermatozoide normal; B: Espermatozoide com largos vacúolos.....	45
Figura 2. Porcentagem de espermatozoides morfolologicamente normal pelo MSOME, de acordo com a idade, comparando três grupos.....	49
Figura 3. Porcentagem de espermatozoides com largos vacúolos (presença de 1 ou mais vacúolos ocupando > 50% da area nuclear) de acordo com a idade, comparando três grupos	50
Figura 4. Relação entre a idade masculina (anos) e a porcentagem de espermatozoides morfolologicamente normal avaliado pelo MSOME..	51
Figura 5. Relação entre a idade masculina (anos) e a porcentagem de espermatozoides com largos vacúolos nucleares (presença de 1 ou mais vacúolos ocupando > 50% da area nuclear) avaliado pelo MSOME.	52

Lista de Abreviaturas

DNA: Ácido desoxirribonucléico

FIV: Fertilização in vitro

ICSI: Injeção intracitoplasmática de espermatozoides

ml: Mililitro

MSOME: Morfologia espermática em alta magnificação

RA: Reprodução assistida

ROS: Espécies reativas de oxigênio

Capítulo I

Idade masculina: qualidade do sêmen e fertilidade

Idade masculina: qualidade do sêmen e fertilidade

Liliane FI Silva^{1,2,3}

¹Departamento de Ginecologia e Obstetrícia, Faculdade de Medicina de Botucatu UNESP -
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Botucatu, Brasil

²Centro de Reprodução Humana Professor Franco Jr , Ribeirão Preto, Brasil

³Centro Paulista de Diagnóstico, Pesquisa e Treinamento, Ribeirão Preto, Brazil

Resumo

Poucos estudos avaliando o efeito da idade paterna nos resultados de RA tem sido descritos na literatura. A idade avançada do homem parece influenciar na função reprodutiva masculina em menor grau quando comparada com a idade da mulher, pelo simples fato da ocorrência de nascimentos de crianças de pais com idade entre 70 e 94 anos. O efeito da idade paterna na qualidade do sêmen tem sido discutido na literatura porém os resultados são contraditórios. Frente a tais contradições, este artigo de revisão tem como objetivo descrever e discutir os dados da literatura no que diz respeito a influência da idade paterna nos parâmetros seminais (volume, concentração, motilidade e morfologia) , nos danos do DNA espermático , nos resultados de reprodução assistida (fertilização, desenvolvimento embrionário, implantação, gravidez, aborto e nascimentos) e em doenças genéticas.

Palavras-chaves: parametros seminais, idade masculina, reprodução assistida.

Summary

Few studies evaluating the effect of paternal age on the results of ART has been described in the literature. Advanced paternal age seems to influence the male reproductive function to a lesser degree than the female's, as evidenced by the fact that babies have been fathered by aged 70 to 94 years. The effect of paternal age on semen quality has been discussed in the literature but the results are not consistent. Front these contradictions this review article aims to describe and discuss the literature data on the influence of paternal age on the semen parameters (volume, concentration, motility and morphology), sperm DNA damage, outcomes of ART (fertilization, embryo development, implantation, pregnancy, abortion and birth) and genetic disease.

Keywords: seminal parameters, male age, assisted reproduction.

Introdução

A infertilidade é definida pela inabilidade de um casal sexualmente ativo de obter a gravidez após 12 meses ou mais de coito regular não protegido [1]. Aproximadamente 15% dos casais são inférteis, e mais de um quarto dos casos de podem ser atribuídos a fatores masculinos [2]. Ao contrário das mulheres não há para os homens limite etário crítico conhecido para produção de gameta. No entanto, tem sido reportada associação entre a idade paterna avançada e alterações na qualidade do sêmen e/ou a risco maior de infertilidade. Essa possível relação assume particular importância quando se considera a tendência atual entre os casais de postergar a reprodução. De fato, tem sido observado aumento progressivo nas taxas de nascimento de pais com idade superior a 35 anos [3]. Além disso, a idade paterna avançada tem sido implicada no aumento da frequência de abortos espontâneos [4-7] e de patologias autossômicas dominantes, aneuploidias e outras doenças na prole [8-16].

Dessa forma, compreender os efeitos da idade sobre a fertilidade é relevante especialmente quando se observa que os aumentos na expectativa de vida e na disponibilidade de tecnologias de reprodução assistida elevaram a oportunidade dos homens terem filhos em idades mais avançadas.

Tendo por base essas considerações, o objetivo dessa revisão foi analisar a associação entre a idade e a qualidade do sêmen e a fertilidade masculina.

A - PARÂMETROS SEMINAIS

A fisiopatologia do impacto da idade nos parâmetros seminais pode ocorrer tanto devido a efeitos específicos da idade por si só quanto por fatores associados como doenças vasculares, obesidade, infecções das glândulas reprodutivas ou acúmulo de substâncias tóxicas.

O efeito da idade paterna na qualidade do sêmen tem sido discutido na literatura porém os resultados não são concordantes. Alguns artigos têm demonstrado uma deterioração do sêmen com o aumento da idade [17-21] porém outros estudos não tem relatado o mesmo [22-24]. Deve ser destacado contudo que o desenho dos diferentes trabalhos publicados e as respectivas populações são bastante heterogêneos. Enquanto alguns utilizaram voluntários, outros basearam a pesquisa em populações de clínicas de infertilidade. Essa diferença dificulta a interpretação dos resultados.

A1) Volume

A maioria dos estudos reporta uma diminuição no volume do sêmen em relação ao avanço da idade do homem. Homonnai *et al.* [25] observaram uma diminuição de 30% no volume dos homens mais velhos (média de idade 54 anos) do que no grupo de homens mais jovens (média de idade 31 anos). Singer *et al.* [26] avaliaram os parâmetros seminais de 286 homens com concentração acima de 200 milhões/ml, que foram divididos em 3 grupos de acordo com o volume do sêmen, grupo 1: menos de 1ml (baixo), grupo 2: 1ml – 5ml (normal) e grupo 3: ≥ 6 ml (alto). Observaram que os pacientes que apresentavam baixo volume espermático, eram mais velhos do que aqueles pacientes que apresentavam volume normal. Rolf *et al.* [27] avaliaram 117 homens inférteis que foram randomizados em 3 grupos sendo 39 homens em cada: grupo A: homens > 50 anos, grupo B: < 30 anos, combinados (matched)

com os pacientes do grupo A de acordo com o ano da sua primeira visita à clínica e grupo C: < 30 anos (combinados (matched) com os pacientes do grupo A de acordo idade da esposa). O volume e a motilidade no grupo A foram menores em comparação aos grupos B e C.

Fisch *et al.* [28] e Andolz *et al.* [29] relataram que a diminuição do volume é mais notada em homens acima de 50 anos. Os autores investigaram a idade como uma variável contínua e encontraram diminuição do volume seminal na proporção de 0,15% [28] e 0,5% [29] respectivamente para cada ano acrescido na idade. Spandorfer *et al.* [21] analisaram 821 casos de ICSI e observaram um declínio no volume do sêmen de 0,6ml em pacientes com idade ≥ 50 anos comparado com homens com idade ≤ 30 anos. Outros estudos relatam uma diminuição do volume seminal em homens idosos que varia de 0,6 a 0,9 ml [27, 30, 31]. Brahem *et al.* [32] avaliaram os parâmetros seminiais de 140 homens inférteis e férteis com idade entre 24-70 anos e observaram que tanto homens férteis quanto inférteis apresentaram uma diminuição de volume, que variou de 0,4 a 0,8 ml no homens com idade ≥ 50 anos comparado com os mais novos (< 50 anos). Mais recentemente, Mukhopadhyay *et al.* [33] avaliando os parâmetros seminiais de 3.729 homens, entre as décadas de 1980 e 2000, observaram mudanças significativas no volume e motilidade espermática correlacionada com a idade do homem.

São poucos os relatos que não encontraram correlação entre o volume espermático e a idade do homem [17, 18, 22, 31, 34, 35]. Alguns estudos relataram uma diminuição no volume em homens mais jovens (21 - 25 anos) e nos homens mais velhos (46 – 50 anos) , com volume maior nos homens com idade entre 26 - 45 anos [17, 18, 22, 35].

É importante destacar que a maioria dos estudos não procedeu a controle de potenciais fatores de viés (fumo, álcool, etiologia da infertilidade, etc). Existem evidências na literatura de que o intervalo de abstinência aumenta o volume [29, 34, 36, 37]. Maior duração da abstinência em homens mais velhos poderia ser um viés responsável pela contradição

entre os resultados. Entretanto, estudo no qual o controle do tempo de abstinência foi realizado demonstrou uma diminuição no volume com o aumento da idade [17].

A2) Concentração

Não existe um consenso em relação à influência da idade masculina na concentração espermática. Alguns estudos relataram uma diminuição da concentração de espermatozoides com aumento da idade [25, 31, 34, 35, 38, 39]. Homonnai *et al.* [25] encontraram um aumento de quase 3 vezes no percentual de homens com concentração espermática inferior a 5 milhões/ml no grupo mais velho (≥ 50 anos). Auger *et al.* [34] reportaram o maior declínio na concentração de espermatozoides com a idade em trabalho que incluiu o tempo de abstinência e ano de nascimento como variáveis independentes em um modelo de regressão múltipla. Nesse estudo os autores observaram uma diminuição na concentração espermática de 3,3% por ano. Haidl *et al.* [35] avaliaram 29 homens com idade entre 45 - 69 anos e 35 homens entre 26 - 35 anos e constataram quase metade da concentração de espermatozoides no grupo mais velho em comparação ao grupo mais jovem. Aboulghar *et al.* [38] avaliaram 454 homens que foram divididos em 2 grupos: Grupo A: 227 homens ≥ 50 anos e Grupo B: 227 homens < 50 anos. Os autores observaram uma diferença significativa ($P=0,05$) na contagem de espermatozoides (Grupo A: 39.0 ± 26.3 milhões/ml, Grupo B: 46.0 ± 32 milhões/ml). Luna *et al.* [39] avaliando um total de 672 homens que foram divididos em 3 grupos: Grupo A: 233 homens < 40 anos, Grupo B: 323 homens 40 - 49 anos e Grupo C: 116 homens > 50 anos, encontraram queda significativa ($P<0,05$) na concentração espermática no grupo mais velho (Grupo C: 58.6 ± 56.5 milhões/ml) quando comparado aos grupos mais jovens (Grupo A: 75.5 ± 54.6 milhões/ml, Grupo B: 76.2 ± 62 milhões/ml)

Por outro lado, outros estudos relataram que a concentração do sêmen aumenta com a idade [24, 26-31]. Nieschlag *et al.* [30] analisaram os parâmetros seminais de 23 avôs com

idade entre 60 – 88 anos e compararam com 20 pais saudáveis com idade entre 24 – 37 anos e encontraram um grande aumento na concentração de espermatozoides no grupo de homens mais velhos ($\mu=120$ milhões/ml) em comparação ao grupo mais jovem ($\mu=78$ milhões/ml). Outros estudos, que ajustaram os resultados considerando fatores potenciais de confusão, relatam aumentos de 0,03% a 3,3% na concentração do esperma por cada ano de vida [24, 28, 29].

Entretanto, alguns estudos demonstraram pouco ou nenhuma associação entre a idade e a concentração de espermatozoides [18, 19, 21, 22, 31, 40-44]. Cavalcante *et al.* [42] avaliaram 531 homens com idade entre 18 - 81 anos e observaram que a idade não influenciava na concentração, motilidade e morfologia espermática.

A3) Motilidade

A maioria dos autores observaram que a motilidade dos espermatozoides diminuiu com o avanço da idade [30, 35, 38, 45-48].

Check *et al.* [47] avaliaram os parâmetros seminais de 570 homens com idade entre 22 - 70 anos. Observaram que homens com > 50 anos apresentaram alterações na velocidade dos espermatozoides. Haidl *et al.* [35] reportaram uma diminuição de 7.3% na motilidade dos espermatozoides de homens mais velhos (idade entre 45 - 69 anos) em comparação a homens mais jovens (idade entre 26 - 35 anos). Nieschlag *et al.*[30] relataram que a motilidade e a frutose seminal diminuiu com o avanço da idade. Slotter *et al.*[46] observaram um declínio na motilidade, na progressão e na velocidade dos espermatozoides dos homens com idade 50 anos.

Em sua análise Aboulghar *et al.*[38] mostraram motilidade significativamente menor ($P<0,0001$). no grupo de homens mais velhos (idade > 50 anos: $37,4 \pm 20,4\%$) versus grupo de homens mais jovens (idade < 50 anos: $46,4 \pm 15,5\%$). Winkle *et al.* [45] descreveram decréscimo na motilidade dos espermatozoides com o aumento da idade: < 30anos: $52.52 \pm$

17.84%, 30 – 35 anos: $47.3 \pm 19.36\%$, 36 – 39 anos: $46.46 \pm 19.09\%$, ≥ 40 anos : $42.8 \pm 19.67\%$. Zhu *et al.* [48] avaliaram os parâmetros seminais de 998 homens com idade entre 20 - 60 anos. Os autores demonstraram que a idade está correlacionada negativamente com a motilidade progressiva, vitalidade e porcentagem de espermatozoides normais

Contudo, alguns autores não encontraram correlação da motilidade com a idade [21, 31, 43, 44, 49, 50]. Além disso Wang *et al.* [18] mostrou uma correlação positiva ($r=0,14$) entre motilidade e a idade.

A4) Morfologia

Vários estudos tem avaliado a correlação entre a idade e a morfologia do esperma, com grande parte desses relatando uma diminuição na porcentagem de espermatozoides normais [17, 27, 29, 31, 34, 35, 51, 52] apesar de nem sempre estatisticamente significativa. Haidl *et al.* [35] Observaram que os homens com idade entre 45 e 69 anos apresentaram uma diminuição na morfologia de 5,8% quando comparado com os homens mais jovens de 26 – 35 anos. Schwartz *et al.* [17] observaram decréscimo pequeno porém significativo da qualidade morfológica com o aumento da idade. Além disso, destacam o aumento na porcentagem de espermatozoides microcéfalos e com anormalidade de cauda. Auger *et al.* [34] relataram que a porcentagem de espermatozoides normais diminuem 0,9% por cada ano. Em estudo retrospectivo com 20.411 homens entre 1960 e 1996, Andolz *et al.* [29] evidenciaram queda estatisticamente significativa ($P < 0,001$) de 3,6% ao ano na porcentagem de espermatozoides normais. Aboulghar *et al.* [38] observaram que os homens ≥ 50 anos apresentaram uma diminuição na morfologia de 7.3% quando comparado com o grupo < 50 anos.

Por outro lado, diferentes estudos não encontraram nenhuma correlação com a idade e a morfologia [19, 21-23, 40, 43, 45, 49, 53]. Entretanto, variações entre os critérios de

classificação morfológica dos espermatozoide dificultam comparações entre os trabalhos sobre a relação com a idade.

Bartoov *et al.* [54] descreveram uma nova metodologia para análise morfológica dos espermatozoides humanos. Esta consiste na avaliação através da utilização de microscópio com lentes Normaski e objetivas específicas (imersão de 100x) que permitem uma maior ampliação do espermatozoide ($\geq 6000x$) comparada com a ampliação utilizada nos métodos tradicionais de avaliação da morfologia espermática (1000x). Essa metodologia denominada MSOME (motile sperm organelle morphology examination) possibilita a observação detalhada dos espermatozoides dando particular ênfase na presença de vacúolos nucleares que estão associados a danos do DNA [55-57]. Recentemente, Oliveira *et al.* [58] avaliando a correlação entre a classificação morfológica por MSOME e a classificação pelos critérios de Kruger, demonstraram uma correlação positiva significativa entre a porcentagem de formas normais avaliados pelos métodos de Kruger e pelo MSOME ($r = 0.83, P < 0,0001$). Os autores demonstraram uma incidência significativamente maior de espermatozoides normais avaliados pelo critério de Kruger (9,4%) comparada com método do MSOME (3,3%), concluindo ser o MSOME um método muito mais criterioso para a classificação do espermatozoide normal. De Almeida *et al.* [59] analisaram amostras de sêmen de 50 pacientes pelo MSOME encontraram correlação positiva entre a idade e a presença de vacúolos nucleares

B - DANO DO DNA ESPERMÁTICO

Diferentes estudos tem demonstrado uma correlação positiva da idade com dano de DNA do sêmen [15, 60-64]. Wyrobek *et al.* [15] avaliando os parâmetros do sêmen, fragmentação do DNA, integridade da cromatina, mutações genéticas e anormalidades cromossômicas em 97 homens com idade entre 20 - 80 anos, observaram uma correlação positiva entre a idade e o nível de fragmentação do DNA.

Moskovtsev *et al.* [60] analisaram 1.125 amostras de sêmen e avaliaram a fragmentação do DNA. Os pacientes foram subdivididos pela idade, entre 30 e 45 anos (n=979 / 87%), < 30 anos (n = 57/ 5%) e >45 anos (n = 89 / 8%). O grupo de homens mais velhos (≥ 45 anos) apresentou níveis mais elevados de fragmentação do DNA em comparação com os demais grupos.

Vagnini *et al.* [61] avaliaram a influência da idade sobre o dano de DNA espermático de 508 homens que foram divididos em 3 grupos: grupo I: ≤ 35 anos, grupo II: 36-39 anos e grupo III: ≥ 40 anos. Observaram que a fragmentação do DNA foi significativamente menor no grupo I do que no grupo II ou III. Além disso, demonstraram um aumento significativo no dano do DNA com o aumento da idade ($r=0,10$, $P = 0,02$).

Belloc *et al.* [63] em estudo retrospectivo incluído 1.769 pacientes observaram correlação positiva baixa ($r = 0,16$) mas estatisticamente significativa ($P < 0,001$); entre a fragmentação do DNA espermático e a idade

Colin *et al.* [64] avaliaram homens com idade entre 20 e 68 anos que foram divididos em 5 grupos: Grupo 1: 20 – 30 anos, Grupo 2: 31 – 40 anos. Grupo 3: 41 – 50 anos, Grupo 4: 51 – 60 anos e Grupo 5: 61 – 70 anos. Observaram um aumento na fragmentação do DNA espermático nos homens com mais de 41 anos.

Os danos no DNA espermático estão relacionados com diferentes situações patogênicas dependente da idade (ex: infecções genitais, câncer, drogas e varicocele), a maioria delas associadas com alterações nos níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS / reactive oxygen species). O sêmen é um líquido biológico formado por plasma seminal, que contém produtos bioquímicos essenciais, tais como os antioxidantes [65, 66], além de diferentes células: espermatozoides maduros e imaturos, células redondas em diferentes estágios da espermatogênese, leucócitos e células epiteliais [65]. Destes diferentes tipos de células os leucócitos e os espermatozoides são as principais fontes de produção de ROS, como por exemplo, íons de oxigênio, radicais livres e peróxidos [66]. A produção de ROS pelos espermatozoides correlaciona inversamente com seu estado de maturidade celular. Os espermatozoides imaturos são frequentemente caracterizados pela presença de excesso de resíduos citoplasmáticos [66]. Essas estruturas, são resultados de uma espermatogênese defeituosa responsáveis por uma grande produção de ROS [65]. As ROS danificam a membrana espermática, reduzem a motilidade dos espermatozoides e alteram diretamente o DNA espermático [66], e conseqüentemente, reduzem a qualidade seminal [67, 68].

Contudo, outros estudos não demonstraram correlação entre a idade e os danos de DNA [32, 45]. Winkle *et al.* [45] avaliando os parâmetros seminais e o DNA fragmentação de 320 homens divididos em quatro grupos: < 30 anos, 30 - 35 anos, 36-39 anos e \geq 40 anos, não observaram mudança na fragmentação do DNA de espermatozoides provenientes de homens mais velhos. Brahem *et al.* [32] analisaram amostras de sêmen de 140 pacientes inférteis (24 - 76 anos) e 50 homens com a fertilidade comprovada (25 - 65 anos). Não houve correlação entre a idade e o nível de fragmentação do DNA em nenhum dos grupos.

C - GENÉTICA

Apesar de relatos contraditórios, as evidências sugerem que o aumento da idade masculina está associado com uma alta frequência de doenças genéticas recessivas e dominantes ligadas ao cromossomo X, aneuploidias, mutações, apoptose, imprinting genético e outras anormalidades cromossômicas [12, 60, 62, 63, 69, 70]. Tais observações poderiam ser explicadas pelo fato das células germinativas masculinas passarem por muitas e contínuas replicações mitóticas (± 850 até os 50 anos), podendo ocorrer algum erro na duplicação do DNA devido ao envelhecimento. Estima-se que as células da espermatogônias se dividem 30 vezes antes da puberdade e depois disso a cada 16 dias [71]. Além disso, podem ser incluídos como mecanismos idade-relacionados de possível indução de alterações genéticas o acúmulo de danos de origem ambiental, a redução da eficiência de reparo do DNA, o aumento da instabilidade genômica, influências hormonais, supressão da apoptose e diminuição da eficácia dos antioxidantes e micronutrientes. Rives *et al.* [72] avaliaram a frequência de aneuploidia nos espermatozoides em 16 homens com idade entre 47 e 71 anos. Os autores observaram que a idade está relacionada com alterações na separação do cromossomo na primeira e na segunda divisão meiótica.

O avanço da idade paterna é, portanto, considerado importante causa de novas mutações em populações humanas [71] e poderia ser responsável por um acúmulo de mutações no pool genético humano, levando possivelmente a uma maior incidência de recessivas desordens genéticas. No entanto, a demonstração de um efeito da idade paterna sobre distúrbios citogenéticos em estudos epidemiológicos não é tarefa fácil devido ao pequeno número de indivíduos afetados por cada síndrome e porque os embriões cromossomicamente anormais são perdidos em diferentes estágios no útero levando a viés de averiguação. Além disso, por vezes não é possível fazer a diferenciação entre efeitos maternos e paternos.

D) FERTILIDADE

Estudos relatam que as taxas de gravidez diminuem com o avanço da idade do homem. Abramsson *et al.* [19] observaram redução nas taxas de gravidez de $\pm 50\%$ em casais em que os homens tinham ≥ 35 anos quando comparados com casais em que os homens tinham < 30 e < 35 anos. Mathieu *et al.* [73] também descreve essa correlação negativa entre idade masculina e gravidez. Outros autores relataram uma diminuição variando de 20% a 38% nas taxas de gravidez [27, 74-76].

Ford *et al.* [77] evidenciaram declínio da fecundidade em homens mais velhos. Em estudo com 8.515 casais planejando gravidez observaram que o aumento da idade paterna está correlacionado positivamente a atraso na concepção. Coccuzza *et al.* [62] sugerem que a paternidade tardia pode reduzir as chances de engravidar e que com o avanço da idade os homens se tornam menos férteis.

Por outro lado, o efeito da idade masculina nos resultados de reprodução assistida é conflitante. Alguns trabalhos defendem influência negativa da idade no desenvolvimento embrionário, taxas de fertilização, implantação e gravidez. Klonoff-Cohen *et al.* [50] em um estudo retrospectivo considerando 221 casais submetidos a FIV, avaliaram os efeitos do idade paterna nos resultados. A cada ano adicional a idade paterna foi associada com aumento de 11% nas chances de não conseguir uma gravidez e de nas probabilidades de 12% de não ter um parto bem-sucedido. Para o primeiro ciclo de FIV, cada ano adicional de idade paterna foi associado com uma probabilidade 5% maior de não conseguir uma gravidez, enquanto que para os ciclos seguintes de FIV a probabilidade foi de 40%. Em uma análise incluindo mais de 1,938 casais submetidos a FIV, de la Rochebrochard *et al.* [78] mostraram um efeito claro do aumento da idade paterna nos resultados, concluindo que homens com mais de 40 anos apresentam maior risco de não conseguirem engravidar suas parceiras devido ao

envelhecimento biológico. Ferreira *et al.* [44] avaliaram o efeito da idade do sexo masculino sobre os resultados de ICSI. Observaram que quando a concentração do sêmen foi anormal, a idade influenciava nas taxas de implantação.

Contudo, a maioria dos estudos não demonstraram correlação positiva entre idade masculina e os resultados dos tratamentos de reprodução assistida [21, 31, 39, 43, 44, 50]. Spandorfer *et al.* [21] analisaram 821 casos de ICSI para investigar a influência da idade materna e paterna. Os autores concluíram que o resultado de gravidez após ICSI está relacionado principalmente com a idade maternal e não paterna. Aboulghar *et al.* [38] em um estudo retrospectivo com 454 casais não encontraram influência estatisticamente significativa da idade paterna nas taxas de gravidez. Duran *et al.* [79] relataram que a qualidade do embrião e as taxas gravidez clínica, implantação, aborto e de nascidos não são afetadas com o avanço da idade do homem. Dain *et al.* [80] através de uma revisão na literatura avaliaram a associação entre a idade paterna e os resultados das técnicas em reprodução assistida. Os estudos incluídos na revisão não mostraram correlação entre a idade paterna avançada e as taxas de fertilização, implantação, gravidez, aborto e nascimento. A idade paterna não afetou a qualidade dos embriões na fase de clivagem. No entanto, uma diminuição significativa na formação de blastocisto foi associada com a idade paterna avançada, provavelmente refletindo a ativação genômica do sexo masculino nos embriões

Estudos avaliando o impacto da idade do homem em ciclos de doação de oócitos de doadoras também relatam resultados contraditórios. Alguns não apresentam relação com a idade do homem e os resultados [41, 49]. Whitcomb *et al.* [81] em estudo retrospectivo avaliando a relação entre a idade masculina e taxas de gravidez em 1392 ciclos de doação de oócito observaram que quando o número de ciclos de tratamento e idade feminina foram considerados, a idade masculina não teve associação significativa com as taxas de gravidez. Contudo Frattarelli *et al.* [43] observaram que homens com > 50 anos apresentam uma

diminuição nas taxas de gravidez e na formação de blastocistos. Além disso, Luna *et al.* [39] observaram um declínio nas taxas de fertilização com o avanço da idade masculina.

Outro ponto de consideração são as evidências de um risco crescente de morte fetal e aborto com idade paterna avançada. Em uma análise retrospectiva, incluindo mais de 3.174 casais de la Rochebrochard e Thonneau [4] reportaram que em mulheres com 20 - 29 anos de idade, o risco de aborto não era significativamente influenciado pela idade do homem. Em mulheres com 30 - 34 anos de idade, o risco de aborto foi maior quando os parceiros tinham com ≥ 40 anos. Mulheres com ≥ 35 anos apresentaram risco de abortamento independente da idade do homem.

Outra análise retrospectiva com 2.414 gestações e uma taxa de 12,2% de aborto espontâneo confirma os efeitos deletérios da idade paterna. Foi observado que o risco de aborto espontâneo aumenta significativamente quando os homens têm 35 anos ou mais [6].

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os dados de literatura sugerem risco de redução na qualidade do sêmen e na fertilidade associado ao aumento na idade masculina. Esta observação tem importância quando se considera a tendência na sociedade para o adiamento da paternidade. Porém, devido à diversidade de resultados encontrados, para conclusões definitivas, estudos futuros examinando a relação entre a idade masculina e qualidade do sêmen e / ou fertilidade ainda são necessários. Contudo, deve-se ser destacado que é essencial a inclusão de grandes amostras populacionais e aplicação de rigor metodológico para melhoria na confiabilidade dos resultados. Outras tecnologias de avaliação da qualidade seminal como o MSOME, também deveriam ser analisados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **Definitions of infertility and recurrent pregnancy loss.** *Fertil Steril* 2008, **89**:1603.
2. Templeton A: **Infertility-epidemiology, aetiology and effective management.** *Health Bull (Edinb)* 1995, **53**:294-298.
3. Ventura SJ, Martin JA, Curtin SC, Mathews TJ: **Report of final natality statistics, 1996.** *Mon Vital Stat Rep* 1998, **46**:1-99.
4. de la Rochebrochard E, Thonneau P: **Paternal age and maternal age are risk factors for miscarriage; results of a multicentre European study.** *Hum Reprod* 2002, **17**:1649-1656.
5. Nybo Andersen AM, Hansen KD, Andersen PK, Davey Smith G: **Advanced paternal age and risk of fetal death: a cohort study.** *Am J Epidemiol* 2004, **160**:1214-1222.
6. Slama R, Bouyer J, Windham G, Fenster L, Werwatz A, Swan SH: **Influence of paternal age on the risk of spontaneous abortion.** *Am J Epidemiol* 2005, **161**:816-823.
7. Kleinhaus K, Perrin M, Friedlander Y, Paltiel O, Malaspina D, Harlap S: **Paternal age and spontaneous abortion.** *Obstet Gynecol* 2006, **108**:369-377.
8. Zhang Y, Kreger BE, Dorgan JF, Cupples LA, Myers RH, Splansky GL, Schatzkin A, Ellison RC: **Parental age at child's birth and son's risk of prostate cancer. The Framingham Study.** *Am J Epidemiol* 1999, **150**:1208-1212.
9. Malaspina D, Harlap S, Fennig S, Heiman D, Nahon D, Feldman D, Susser ES: **Advancing paternal age and the risk of schizophrenia.** *Arch Gen Psychiatry* 2001, **58**:361-367.
10. Fisch H, Hyun G, Golden R, Hensle TW, Olsson CA, Liberson GL: **The influence of paternal age on down syndrome.** *J Urol* 2003, **169**:2275-2278.
11. Glaser RL, Broman KW, Schulman RL, Eskenazi B, Wyrobek AJ, Jabs EW: **The paternal-age effect in Apert syndrome is due, in part, to the increased frequency of mutations in sperm.** *Am J Hum Genet* 2003, **73**:939-947.
12. Slotter E, Nath J, Eskenazi B, Wyrobek AJ: **Effects of male age on the frequencies of germinal and heritable chromosomal abnormalities in humans and rodents.** *Fertil Steril* 2004, **81**:925-943.
13. Lambert SM, Masson P, Fisch H: **The male biological clock.** *World J Urol* 2006, **24**:611-617.
14. Reichenberg A, Gross R, Weiser M, Bresnahan M, Silverman J, Harlap S, Rabinowitz J, Shulman C, Malaspina D, Lubin G, et al: **Advancing paternal age and autism.** *Arch Gen Psychiatry* 2006, **63**:1026-1032.
15. Wyrobek AJ, Eskenazi B, Young S, Arnheim N, Tiemann-Boege I, Jabs EW, Glaser RL, Pearson FS, Evenson D: **Advancing age has differential effects on DNA damage, chromatin integrity, gene mutations, and aneuploidies in sperm.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006, **103**:9601-9606.
16. Schmid TE, Eskenazi B, Baumgartner A, Marchetti F, Young S, Weldon R, Anderson D, Wyrobek AJ: **The effects of male age on sperm DNA damage in healthy non-smokers.** *Hum Reprod* 2007, **22**:180-187.
17. Schwartz D, Mayaux MJ, Spira A, Moscato ML, Jouannet P, Czyglik F, David G: **Semen characteristics as a function of age in 833 fertile men.** *Fertil Steril* 1983, **39**:530-535.
18. Wang C, Chan SY, Leung A, Ng RP, Ng M, Tang LC, Ma HK, Tsoi WL, Kwan M: **Cross-sectional study of semen parameters in a large group of normal Chinese men.** *Int J Androl* 1985, **8**:257-274.

19. Abramsson L: **On the investigation of men from infertile relations. A clinical study with special regard to anamnesis, physical examination, semen-, hormone- and chromosome analyses, from men with non-"normal" semen.** *Scand J Urol Nephrol Suppl* 1988, **113**:1-47.
20. Carlsen E, Giwercman A, Keiding N, Skakkebaek NE: **Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years.** *Bmj* 1992, **305**:609-613.
21. Spandorfer SD, Avrech OM, Colombero LT, Palermo GD, Rosenwaks Z: **Effect of parental age on fertilization and pregnancy characteristics in couples treated by intracytoplasmic sperm injection.** *Hum Reprod* 1998, **13**:334-338.
22. Berling S, Wolner-Hanssen P: **No evidence of deteriorating semen quality among men in infertile relationships during the last decade: a study of males from Southern Sweden.** *Hum Reprod* 1997, **12**:1002-1005.
23. Hossain AM, Bhaumik D, Selukar R, Huff C, Rizk B, Thorneycroft IH: **Assessment of the relationship of sperm morphology with seminal and other clinical conditions of semen donors.** *Arch Androl* 1997, **39**:111-117.
24. Bujan L, Mansat A, Pontonnier F, Mieuisset R: **Time series analysis of sperm concentration in fertile men in Toulouse, France between 1977 and 1992.** *Bmj* 1996, **312**:471-472.
25. Homonnai ZT, Fainman N, David MP, Paz GF: **Semen quality and sex hormone pattern of 29 middle aged men.** *Andrologia* 1982, **14**:164-170.
26. Singer R, Sagiv M, Levinsky H, Allalouf D: **Andrological parameters in men with high sperm counts and possible correlation with age.** *Arch Androl* 1990, **24**:107-111.
27. Rolf C, Behre HM, Nieschlag E: **Reproductive parameters of older compared to younger men of infertile couples.** *Int J Androl* 1996, **19**:135-142.
28. Fisch H, Goluboff ET, Olson JH, Feldshuh J, Broder SJ, Barad DH: **Semen analyses in 1,283 men from the United States over a 25-year period: no decline in quality.** *Fertil Steril* 1996, **65**:1009-1014.
29. Andolz P, Bielsa MA, Vila J: **Evolution of semen quality in North-eastern Spain: a study in 22,759 infertile men over a 36 year period.** *Hum Reprod* 1999, **14**:731-735.
30. Nieschlag E, Lammers U, Freischem CW, Langer K, Wickings EJ: **Reproductive functions in young fathers and grandfathers.** *J Clin Endocrinol Metab* 1982, **55**:676-681.
31. Gallardo E, Simon C, Levy M, Guanés PP, Remohi J, Pellicer A: **Effect of age on sperm fertility potential: oocyte donation as a model.** *Fertil Steril* 1996, **66**:260-264.
32. Brahem S, Mehdi M, Elghezal H, Saad A: **The effects of male aging on semen quality, sperm DNA fragmentation and chromosomal abnormalities in an infertile population.** *J Assist Reprod Genet* 2011, **28**:425-432.
33. Mukhopadhyay D, Varghese AC, Pal M, Banerjee SK, Bhattacharyya AK, Sharma RK, Agarwal A: **Semen quality and age-specific changes: a study between two decades on 3,729 male partners of couples with normal sperm count and attending an andrology laboratory for infertility-related problems in an Indian city.** *Fertil Steril* 2010, **93**:2247-2254.
34. Auger J, Kunstmann JM, Czyglik F, Jouannet P: **Decline in semen quality among fertile men in Paris during the past 20 years.** *N Engl J Med* 1995, **332**:281-285.
35. Haidl G, Jung A, Schill WB: **Ageing and sperm function.** *Hum Reprod* 1996, **11**:558-560.

36. Mortimer D, Templeton AA, Lenton EA, Coleman RA: **Influence of abstinence and ejaculation-to-analysis delay on semen analysis parameters of suspected infertile men.** *Arch Androl* 1982, **8**:251-256.
37. Pellestor F, Girardet A, Andreo B: **Effect of long abstinence periods on human sperm quality.** *Int J Fertil Menopausal Stud* 1994, **39**:278-282.
38. Aboulghar M, Mansour R, Al-Inany H, Abou-Setta AM, Mourad L, Serour G: **Paternal age and outcome of intracytoplasmic sperm injection.** *Reprod Biomed Online* 2007, **14**:588-592.
39. Luna M, Finkler E, Barritt J, Bar-Chama N, Sandler B, Copperman AB, Grunfeld L: **Paternal age and assisted reproductive technology outcome in ovum recipients.** *Fertil Steril* 2009, **92**:1772-1775.
40. Lemcke B, Behre HM, Nieschlag E: **Frequently subnormal semen profiles of normal volunteers recruited over 17 years.** *Int J Androl* 1997, **20**:144-152.
41. Bellver J, Garrido N, Remohi J, Pellicer A, Meseguer M: **Influence of paternal age on assisted reproduction outcome.** *Reprod Biomed Online* 2008, **17**:595-604.
42. Cavalcante MB, Rocha Mde P, Dias ML, Dias OJ, Souza DO, Roberto IG: **[Interference of age on semen quality].** *Rev Bras Ginecol Obstet* 2008, **30**:561-565.
43. Frattarelli JL, Miller KA, Miller BT, Elkind-Hirsch K, Scott RT, Jr.: **Male age negatively impacts embryo development and reproductive outcome in donor oocyte assisted reproductive technology cycles.** *Fertil Steril* 2008, **90**:97-103.
44. Ferreira RC, Braga DP, Bonetti TC, Pasqualotto FF, Iaconelli A, Jr., Borges E, Jr.: **Negative influence of paternal age on clinical intracytoplasmic sperm injection cycle outcomes in oligozoospermic patients.** *Fertil Steril* 2010, **93**:1870-1874.
45. Winkle T, Rosenbusch B, Gagsteiger F, Paiss T, Zoller N: **The correlation between male age, sperm quality and sperm DNA fragmentation in 320 men attending a fertility center.** *J Assist Reprod Genet* 2009, **26**:41-46.
46. Slotter E, Schmid TE, Marchetti F, Eskenazi B, Nath J, Wyrobek AJ: **Quantitative effects of male age on sperm motion.** *Hum Reprod* 2006, **21**:2868-2875.
47. Check JH, Shanis B, Bollendorf A, Adelson H, Breen E: **Semen characteristics and infertility in aging.** *Arch Androl* 1989, **23**:275-277.
48. Zhu QX, Meads C, Lu ML, Wu JQ, Zhou WJ, Gao ES: **Turning point of age for semen quality: a population-based study in Chinese men.** *Fertil Steril* 2011, **96**:572-576.
49. Paulson RJ, Milligan RC, Sokol RZ: **The lack of influence of age on male fertility.** *Am J Obstet Gynecol* 2001, **184**:818-822; discussion 822-814.
50. Klonoff-Cohen HS, Natarajan L: **The effect of advancing paternal age on pregnancy and live birth rates in couples undergoing in vitro fertilization or gamete intrafallopian transfer.** *Am J Obstet Gynecol* 2004, **191**:507-514.
51. Centola GM, Eberly S: **Seasonal variations and age-related changes in human sperm count, motility, motion parameters, morphology, and white blood cell concentration.** *Fertil Steril* 1999, **72**:803-808.
52. Mladenovic I, Micic S, Papic N, Genbacev O, Marinkovic B: **Sperm morphology and motility in different age populations.** *Arch Androl* 1994, **32**:197-205.
53. Nijs M, De Jonge C, Cox A, Janssen M, Bosmans E, Ombelet W: **Correlation between male age, WHO sperm parameters, DNA fragmentation, chromatin packaging and outcome in assisted reproduction technology.** *Andrologia* 2011, **43**:174-179.
54. Bartoov B, Berkovitz A, Eltes F, Kogosowski A, Menezes Y, Barak Y: **Real-time fine morphology of motile human sperm cells is associated with IVF-ICSI outcome.** *J Androl* 2002, **23**:1-8.

55. Franco JG, Jr., Baruffi RL, Mauri AL, Petersen CG, Oliveira JB, Vagnini L: **Significance of large nuclear vacuoles in human spermatozoa: implications for ICSI.** *Reprod Biomed Online* 2008, **17**:42-45.
56. Franco Jr JG, Mauri AL, Petersen CG, Massaro FC, Silva LF, Felipe V, Cavagna M, Pontes A, Baruffi RL, Oliveira JB, Vagnini LD: **Large nuclear vacuoles are indicative of abnormal chromatin packaging in human spermatozoa.** *Int J Androl* 2011.
57. Oliveira JB, Massaro FC, Baruffi RL, Mauri AL, Petersen CG, Silva LF, Vagnini LD, Franco JG, Jr.: **Correlation between semen analysis by motile sperm organelle morphology examination and sperm DNA damage.** *Fertil Steril* 2010, **94**:1937-1940.
58. Oliveira JB, Massaro FC, Mauri AL, Petersen CG, Nicoletti AP, Baruffi RL, Franco JG, Jr.: **Motile sperm organelle morphology examination is stricter than Tygerberg criteria.** *Reprod Biomed Online* 2009, **18**:320-326.
59. de Almeida Ferreira Braga DP, Setti AS, Figueira RC, Nichi M, Martinhago CD, Iaconelli A, Jr., Borges E, Jr.: **Sperm organelle morphologic abnormalities: contributing factors and effects on intracytoplasmic sperm injection cycles outcomes.** *Urology* 2011, **78**:786-791.
60. Moskovtsev SI, Willis J, Mullen JB: **Age-related decline in sperm deoxyribonucleic acid integrity in patients evaluated for male infertility.** *Fertil Steril* 2006, **85**:496-499.
61. Vagnini L, Baruffi RL, Mauri AL, Petersen CG, Massaro FC, Pontes A, Oliveira JB, Franco JG, Jr.: **The effects of male age on sperm DNA damage in an infertile population.** *Reprod Biomed Online* 2007, **15**:514-519.
62. Cocuzza M, Athayde KS, Agarwal A, Sharma R, Pagani R, Lucon AM, Srougi M, Hallak J: **Age-related increase of reactive oxygen species in neat semen in healthy fertile men.** *Urology* 2008, **71**:490-494.
63. Belloc S, Benkhalifa M, Junca AM, Dumont M, Bacrie PC, Menezo Y: **Paternal age and sperm DNA decay: discrepancy between chromomycin and aniline blue staining.** *Reprod Biomed Online* 2009, **19**:264-269.
64. Colin A, Barroso G, Gomez-Lopez N, Duran EH, Oehninger S: **The effect of age on the expression of apoptosis biomarkers in human spermatozoa.** *Fertil Steril* 2010, **94**:2609-2614.
65. Agarwal A, Makker K, Sharma R: **Clinical relevance of oxidative stress in male factor infertility: an update.** *Am J Reprod Immunol* 2008, **59**:2-11.
66. Tremellen K: **Oxidative stress and male infertility--a clinical perspective.** *Hum Reprod Update* 2008, **14**:243-258.
67. Alkan I, Simsek F, Haklar G, Kervancioglu E, Ozveri H, Yalcin S, Akdas A: **Reactive oxygen species production by the spermatozoa of patients with idiopathic infertility: relationship to seminal plasma antioxidants.** *J Urol* 1997, **157**:140-143.
68. Nallella KP, Sharma RK, Aziz N, Agarwal A: **Significance of sperm characteristics in the evaluation of male infertility.** *Fertil Steril* 2006, **85**:629-634.
69. Singh NP, Muller CH, Berger RE: **Effects of age on DNA double-strand breaks and apoptosis in human sperm.** *Fertil Steril* 2003, **80**:1420-1430.
70. Thacker PD: **Biological clock ticks for men, too: genetic defects linked to sperm of older fathers.** *Jama* 2004, **291**:1683-1685.
71. Crow JF: **Spontaneous mutation in man.** *Mutat Res* 1999, **437**:5-9.

72. Rives N, Langlois G, Bordes A, Siméon N, Macé B: **Cytogenetic analysis of spermatozoa from males aged between 47 and 71 years.** *J Med Genet* 2002, **39**:E63.
73. Mathieu C, Ecochard R, Bied V, Lornage J, Czyba JC: **Cumulative conception rate following intrauterine artificial insemination with husband's spermatozoa: influence of husband's age.** *Hum Reprod* 1995, **10**:1090-1097.
74. Stanwell-Smith RE, Hendry WF: **The prognosis of male subfertility: a survey of 1025 men referred to a fertility clinic.** *Br J Urol* 1984, **56**:422-428.
75. Ducot B, Spira A, Feneux D, Jouannet P: **Male factors and the likelihood of pregnancy in infertile couples. II. Study of clinical characteristics--practical consequences.** *Int J Androl* 1988, **11**:395-404.
76. Brzechffa PR, Daneshmand S, Buyalos RP: **Sequential clomiphene citrate and human menopausal gonadotrophin with intrauterine insemination: the effect of patient age on clinical outcome.** *Hum Reprod* 1998, **13**:2110-2114.
77. Ford WC, North K, Taylor H, Farrow A, Hull MG, Golding J: **Increasing paternal age is associated with delayed conception in a large population of fertile couples: evidence for declining fecundity in older men. The ALSPAC Study Team (Avon Longitudinal Study of Pregnancy and Childhood).** *Hum Reprod* 2000, **15**:1703-1708.
78. de La Rochebrochard E, de Mouzon J, Thepot F, Thonneau P: **Fathers over 40 and increased failure to conceive: the lessons of in vitro fertilization in France.** *Fertil Steril* 2006, **85**:1420-1424.
79. Duran EH, Dowling-Lacey D, Bocca S, Stadtmauer L, Oehninger S: **Impact of male age on the outcome of assisted reproductive technology cycles using donor oocytes.** *Reprod Biomed Online* 2010, **20**:848-856.
80. Dain L, Auslander R, Dirnfeld M: **The effect of paternal age on assisted reproduction outcome.** *Fertil Steril* 2011, **95**:1-8.
81. Whitcomb BW, Turzanski-Fortner R, Richter KS, Kipersztok S, Stillman RJ, Levy MJ, Levens ED: **Contribution of male age to outcomes in assisted reproductive technologies.** *Fertil Steril* 2011, **95**:147-151.

Capítulo II

The effects of male age on sperm analysis by motile sperm organelle morphology examination (MSOME)

Padronizado de acordo com as normas de publicação da revista a que foi enviado: Reproductive Biology and Endocrinology.

The effects of male age on sperm analysis by motile sperm organelle morphology examination (MSOME)

Liliane FI Silva^{1,2,3}, Joao Batista A Oliveira^{1,2,3}, Claudia G Petersen^{1,2,3}, Ana L Mauri^{2,3}, Fabiana C Massaro^{2,3}, Mario Cavagna^{2,3,4}, Ricardo LR Baruffi^{2,3}, José G Franco Jr^{1,2,3,*}

¹Department of Gynaecology and Obstetrics, Botucatu Medical School, São Paulo State University - UNESP, Botucatu, Brazil

²Center for Human Reproduction Prof Franco Jr, Ribeirao Preto, Brazil

³Paulista Centre for Diagnosis, Research and Training, Ribeirao Preto, Brazil

⁴Women's Health Reference Center, Perola Byington Hospital, Sao Paulo, Brazil

*Corresponding author

E-mail addresses:

LFIS: liliane@crh.com.br

JBAO*: joabatista@crh.com.br

CGP: petersenclaudia@crh.com.br

ALM: analucia@crh.com.br

FCM: fabiana@crh.com.br

MC: mariocavagna@crh.com.br

RLRB: baruffir@crh.com.br

JGF: crh@crh.com.br

Abstract

Background: This study aimed to investigate the influence of age on sperm quality, as analysed by motile sperm organelle morphology examination (MSOME).

Methods: Semen samples were collected from 975 men undergoing evaluation or treatment for infertility. The sperm cells were evaluated at 8400x magnification using an inverted microscope equipped with Nomarski (differential interference contrast) optics. Two forms of spermatozoa were considered: normal spermatozoa and spermatozoa with large nuclear vacuoles (LNV, defined as vacuoles occupying >50% of the sperm nuclear area). At least 200 spermatozoa per sample were evaluated, and the percentages of normal and LNV spermatozoa were determined. The subjects were divided into three groups according to age: Group I: ≤35 years, Group II: 36–40 years and Group III: ≥41 years.

Results: There was no difference in percentages of normal sperm between the two younger (I and II) groups ($P>0.05$). The percentage of normal sperm in the older group (III) was significantly lower than that in the younger (I and II) groups ($P<0.05$). There was no difference in the percentage of LNV spermatozoa between the younger (I and II) groups ($P>0.05$). The percentage of LNV spermatozoa was significantly higher in the older group (III) than in the younger (I and II) groups ($P<0.05$). Regression analysis demonstrated a significant decrease in the incidence of normal sperm with increasing the age ($P<0.05$; $r=-0.10$). However, there was a significant positive correlation between the percentage of spermatozoa with LNV and male age ($P<0.05$, $r=0.10$)

Conclusion: The results demonstrated a consistent decline in semen quality, as reflected by morphology evaluated by MSOME, with increased age. Considering the relationship between nuclear vacuoles and DNA damage, these age-related changes predict that increased paternal age should be associated with unsuccessful or abnormal pregnancy as a consequence of fertilisation with damaged spermatozoa. Given that sperm nuclear vacuoles can be evaluated more precisely at high magnification, these results support the routine use of MSOME for ICSI as a criterion for semen analysis.

Keywords: Male age, MSOME, IMSI, sperm morphology, DNA damage

Background

Male fertility is an important contributor to the conception potential of a couple. The evaluation of male fertility is generally made based on the examination of sperm parameters and sperm functionality. Furthermore, epidemiological evidence suggests that there is a decline in semen quality (e.g., volume, motility, and morphology) and male fertility associated with increased male age [1-14]. In addition, advanced paternal age has been implicated in an increased frequency of miscarriages [6, 15-17], autosomal dominant disorders, aneuploidies, and other diseases [18-23].

Among all of the semen parameters studied, sperm morphology has been the best indicator of male fertility because it reflects on the functional competence of the sperm, although none of the semen parameters, either alone or in combination, can be considered definitive. Diverse studies, originating principally from IVF programmes and intrauterine insemination, corroborate the sensitivity of morphology as a prognostic factor [24, 25]. However, the value of traditional semen analysis has been debated.

Innovative methods for the selection of sperm in assisted reproduction techniques (ART) have been published, providing new insights into the correlation between sperm quality and clinical results. To test the hypothesis that subtle sperm organelle malformations are associated with ART results, Bartoov *et al.* [26] proposed a new method for real-time evaluation of sperm morphology, the motile sperm organelle morphology examination (MSOME). MSOME utilises an inverted light microscope equipped with high-power Nomarski optics enhanced by digital imaging to achieve a magnification above >6000x. This magnification is sufficiently high to evaluate spermatozoa according to their fine nuclear morphology, and it is much higher than the magnification typically used by embryologists to select spermatozoa for ICSI (200x to 400x) or even that employed in routine semen examination (1000x). This method led to the development of intracytoplasmic morphologically selected sperm injection (IMSI), which is based on sperm normality – as defined by MSOME classification – and is aimed at improving conventional ICSI outcomes by focusing mainly on the correlation between sperm morphological abnormalities that can be observed at high magnification and DNA damage [27-30]. The most important predictor of sperm quality is the extent of sperm head impairment by the presence of vacuoles. Vacuoles, which are best observed at high magnification, appear to adversely affect embryo development and seem to be related to the abnormal chromatin packaging or to the denaturation and fragmentation of sperm DNA [31-34]. The use of IMSI has revealed that the selection of a morphologically normal sperm nucleus before injection is an important factor

in improving fertilisation rates, embryo quality [27, 35-37], the rate of development up to the blastocyst stage [33, 38, 39], the rates of implantation and pregnancy after embryo transfer on day 2 or 3 [27, 28, 30, 35-37, 40-44] or in the blastocyst stage [33, 38], and the likelihood of having a normal healthy child [45]. IMSI also appears to significantly decrease miscarriage rates [27, 28, 33, 37, 40, 42, 44].

Although MSOME was developed only as a selection criterion, its application as a method for classifying sperm morphology may improve the evaluation of semen quality with potential clinical repercussions, particularly with regard to ART. The objective of the present study was to better define the value of MSOME by using this technique to investigate the influence of age on sperm quality in a group of men from an infertility clinic.

Methods

Population

Semen samples (one per subject) were obtained from 975 men from an unselected group of couples undergoing infertility investigation and treatment at the Centre for Human Reproduction Prof Franco Jr.

Sample Collection

Semen samples were collected in sterile containers by masturbation after a sexual abstinence period of 2-5 days. A portion of each semen sample was immediately taken and processed for MSOME. The liquefied fresh semen samples were prepared using Isolate (Irvine Scientific, USA) discontinuous concentration gradient. The final pellet was resuspended in 0.2 ml modified human tubal fluid (HTF) medium (Irvine Scientific, Santa Ana, CA, USA) and subsequently sent for MSOME. The remainder of the semen sample was used to analyse standard semen quality parameters according to the World Health Organisation guidelines [46].

Determination of morphology by MSOME

An aliquot of 1µl of sperm cell suspension was transferred to a 5µl microdroplet of modified HTF medium containing 7% polyvinylpyrrolidone (PVP medium; Irvine Scientific). This microdroplet was placed in a sterile glass dish (Fluorodish; World Precision Instruments, USA) under sterile paraffin oil (Ovoil-100; VitroLife, Goteborg, Sweden). The sperm cells, suspended in the microdroplet, were placed on a microscope stage above a U Plan Apochromat -100 oil/1.35 objective lens that had previously been covered by a droplet of immersion oil. In this manner, the suspended motile sperm cells in the observation droplet could be examined at high magnification by an inverted microscope (Eclipse TE 2000U; Nikon, Japan) equipped with high-power differential interference contrast optics (DIC/Nomarski). The images were captured by a colour video camera that had sufficient resolution to produce high-quality images and a colour video monitor. The morphological evaluation was performed on a monitor screen, and the combined calculated magnification was 8450x (total magnification: objective magnification = 100x; magnification selector = 1.0x; video coupler magnification = 1.0x; calculated video magnification = 84.50).

Two types of spermatozoa observed via MSOME were counted in this study: normal spermatozoa and spermatozoa with large nuclear vacuoles (LNV). A spermatozoon was classified as morphologically normal when it exhibited a normal nucleus, acrosome, post-acrosomal lamina, neck and tail, and also had no cytoplasm around the head [26]. The subcellular organelles were morphologically classified on the basis of the presence of specific malformations, which were defined according to the arbitrary descriptive approach reported by Bartoov *et al.* [26] based on transmission and scanning electron microscopy studies: the acrosome as absent, partial or vesiculated; the post-acrosomal lamina as absent or vesiculated; neck: the abaxial as disordered or showing cytoplasmic droplet; and the tail as absent, coiled, broken, multi or short.

The morphological state of the nucleus was defined by its shape and chromatin content, also according to transmission electron microscopy estimations [26, 44]. The normal nuclear shape was defined as a smooth, symmetric oval. Normal means for length and width were estimated as 4.75 ± 2.8 and 3.28 ± 0.20 μm [26], respectively, and forms classified as abnormal varied by 2SD in at least one of the axes (length: ≥ 5.31 or ≤ 4.19 μm , width: >3.7 or <2.9 μm). For rapid evaluation of nuclear shape, a fixed, transparent, celluloid form of sperm nucleus fitting the criteria was superimposed on the examined cell (chablon construction based on ASTM E 1951-2[47]). The criterion for normality of chromatin content was the absence of vacuoles occupying $>4\%$ of the sperm nuclear area. Figure 1A shows normal spermatozoa analysed by MSOME.

LNV spermatozoa were defined according to the Bartoov modified classification, i.e., the presence of one or more vacuoles occupying $>50\%$ of the sperm nuclear area (visual evaluation aided, if necessary, by a celluloid form of a large vacuole superimposed on the examined cell). Figure 1B shows LNV spermatozoa analysed by MSOME.

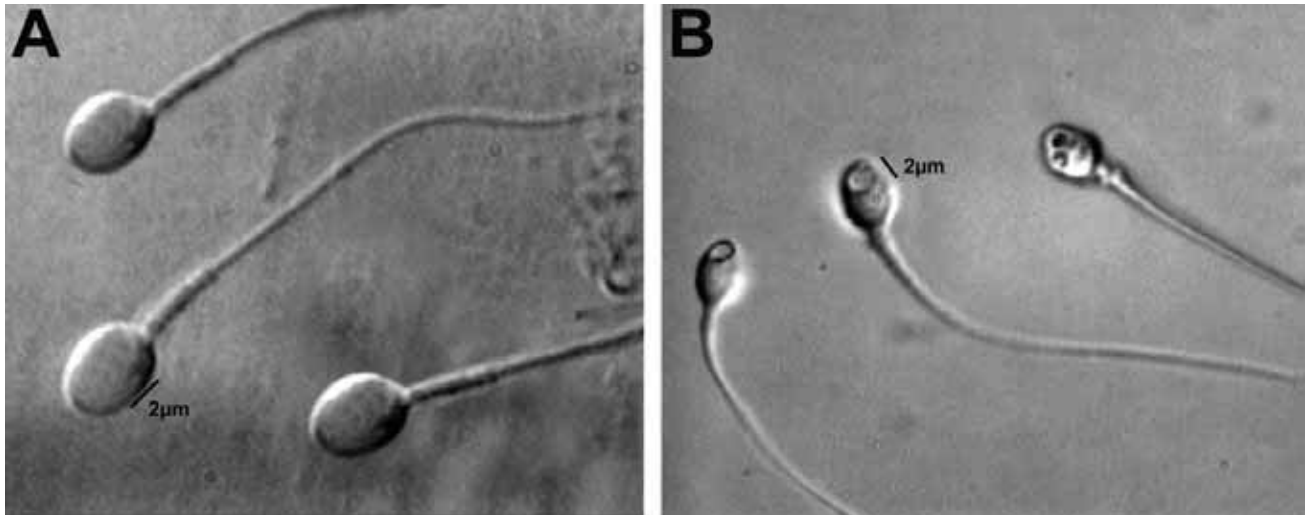


Figure 1. MSOME. Morphological sperm forms observed at high magnification (8450x). A: Normal spermatozoa; B: Spermatozoa with large nuclear vacuoles.

The same technician performed all sperm selection. As in other sperm morphological analyses, each sperm was evaluated/classified individually in MSOME, and the process was carried out directly on the monitor screen. At least 200 motile spermatozoa per sample were evaluated, and the percentages of normal and LNV spermatozoa were determined. The analysis lasted 30-60 min/sample.

Quality control

To control for intra-observer variability, multiple fractions of motile spermatozoa were obtained from randomly selected patients. Each sample was observed at least three times by the same observer. A variation of 0.5% was obtained for all parameters analysed: normality of the spermatozoon as a whole, normality of nuclear form, normality of chromatin, spermatozoon with any nuclear vacuoles, and spermatozoa with vacuoles occupying >50% of the nuclear area. Inter-observer variability was not evaluated because only one observer, blinded to subject identity, performed the entire study.

Statistical analysis

Data were analysed using the StatsDirect statistical software (Cheshire, UK). The Mann–Whitney U test, Student's *t*-test and chi-squared test were used as appropriate. Correlations were performed using the Spearman rank correlation test. Patient age and percentages of normal and LNV spermatozoa were treated as continuous variables for regression and correlation analysis. For two-group comparisons, the following ages were used as cut-off points to divide the subjects into groups: Group I: ≤ 35 years; Group II: 36–40 years; and Group III: ≥ 41 years. The level of significance was set at $P < 0.05$.

Results

Table 1 summarises the general characteristics of the study population. The comparison between the three age groups showed that a significantly higher proportion of older men had fathered at least one child (or a pregnancy which had ended in miscarriage), spontaneously or after fertility treatment, compared to the younger men. Similarly, an increase in the length of the infertile period was also observed with increasing of male age. Furthermore, as observed in other studies, increased sperm DNA fragmentation correlated with increasing age. An equal distribution ($P > 0.05$) of other characteristics was observed for all three groups.

Table 1. General characteristics of the three age groups studied.

Characteristic	Total	Group I (≤35 years)	Group II (36-40years)	Group III (≥41 years)
Patients	975	407	292	276
Age (years)	37.5 ± 6.7	31.7 ± 2.7	37.8 ± 1.3	45.8 ± 5.2
Fathered at least one child	36% (351/975)	23.1% ^{a,b} (94/407)	33.6% ^{a,c} (98/292)	57.7% ^{b,c} (159/276)
Duration of infertility (years)	3.7 ± 3.3	3.0 ± 2.2 ^{d,e}	3.6 ± 2.9 ^{d,f}	5.0 ± 4.5 ^{e,f}
Abstinence (mean ± SD)	3.5±1.3	3.6±1.3	3.5±1.4	3.5±1.3
Sperm Parameters* (mean ± SD)				
-volume (ml)	2.7±0.13	2.8 ± 1.2	2.9 ± 1.2	2.6 ± 1.4
-total sperm count x10 ⁶ /ml	61.2±53.8	62.9 ± 53.0	64.8 ± 53.2	56.0 ± 51.8
-motility (rapid+slow progression)%	58.9±17.9	59.9 ± 17.3	57.6 ± 18.7	54.4 ± 19.2
-leukocytes (x10 ⁶)	0.4±0.9	0.4 ± 0.7	0.4 ± 1.2	0.4 ± 0.7
-vitality (%)	66.5±15.1	68.7 ± 14.1	65.6 ± 15.7	64.2 ± 15.3
Sperm DNA fragmentation (%)	17.1±9.6	15.6 ± 9.1 ^{g,h}	18.1 ± 9.7 ^g	18.3 ± 10.2 ^h
Varicocele (%)	17 (166/975)	14.7 (60/407)	18.5 (54/292)	18.8 (52/276)
Tobacco use (%)	11.9 (116/975)	13.8 (56/407)	10.3 (30/292)	10.9 (30/276)
Regular alcohol use (%)	64.2 (626/975)	65.3 (266/407)	66.4 (194/292)	60.1 (166/276)
Vitamin supplement use (%)	15.5 (151/975)	15.5 (63/407)	13.7 (40/292)	17.4 (48/276)

*Categorised according to World Health Organisation guidelines (2010)

Values within rows with the same superscript letter were significantly different:

^a $P=0.003$

^{b-c-e} $P < 0.0001$

^{d-f} $P = 0.008$

^g $P = 0.0001$

^h $P = 0.0002$

The overall percentage of sperm with normal forms, as analysed by MSOME, was $1.2 \pm 2.0\%$ (range 0–15%). The mean percentage of sperm with normal forms was $1.34 \pm 2.2\%$ (range 0–15%) in Group I, $1.32 \pm 2.1\%$ (range 0–11%) in Group II, and $0.96 \pm 1.7\%$ (range 0–11%) in Group III. There was no difference in the percentage of normal sperm in the two younger (I and II) groups ($P = 0.28$, Mann–Whitney U test). The percentage of normal sperm in the older group (III) was significantly lower than that in both of the younger (I and II) groups ($P = 0.0007$ and $P = 0.04$ respectively, Mann–Whitney U test). Figure 2 summarises these results.

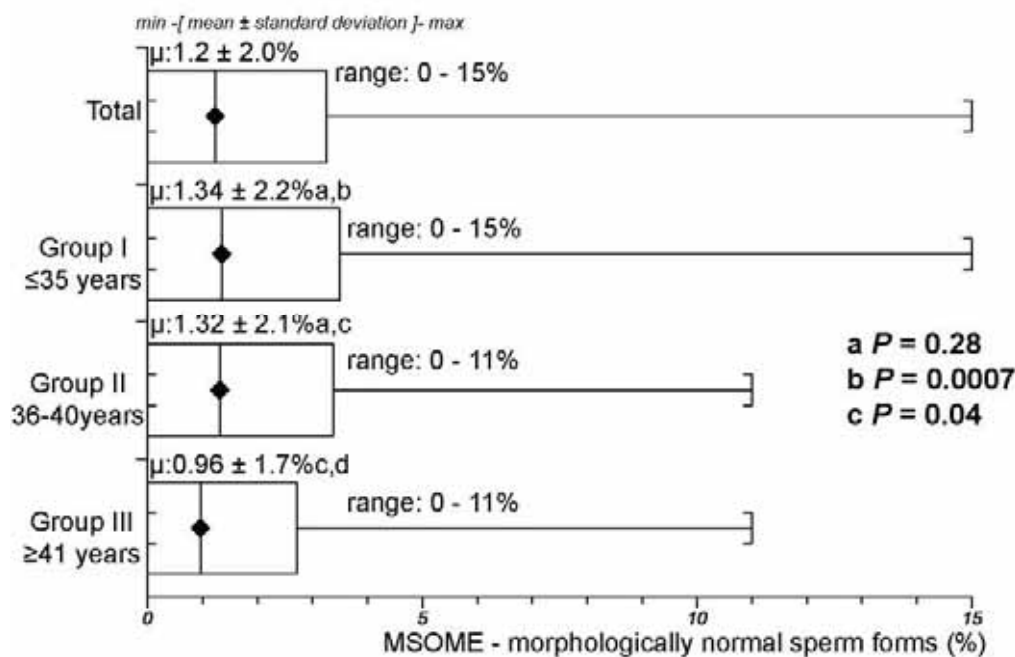


Figure 2. Percentage of morphologically normal sperm forms by MSOME according to age, comparing three age groups. There was no difference in the percentages of normal sperm in the two younger (I and II) groups ($P = 0.28$, Mann–Whitney U test). The percentage of normal sperm in the older group (III) was significantly lower than those in either of the younger (I and II) groups ($P=0.0007$ and $P = 0.04$, Mann–Whitney U test).

The overall percentage of LNV spermatozoa was $30.8 \pm 20.6\%$ (range 2–100%). The mean percentages of LNV spermatozoa were $28.6 \pm 19.0\%$ (range 3–96.5%) in Group I, $31.1 \pm 21.8\%$ (range 2–100%) in Group II, and $33.8 \pm 21.3\%$ (range 2–100%) in Group III. There was no difference in the percentages of spermatozoa with large nuclear vacuoles in the younger (I and II) groups ($P = 0.39$, Mann–Whitney U test). The percentage of spermatozoa with large nuclear vacuoles in the older group (III) was significantly lower than those in both of the younger (I and II) groups ($P = 0.0005$ and $P = 0.021$ respectively, Mann–Whitney U test). Figure 3 summarises these results.

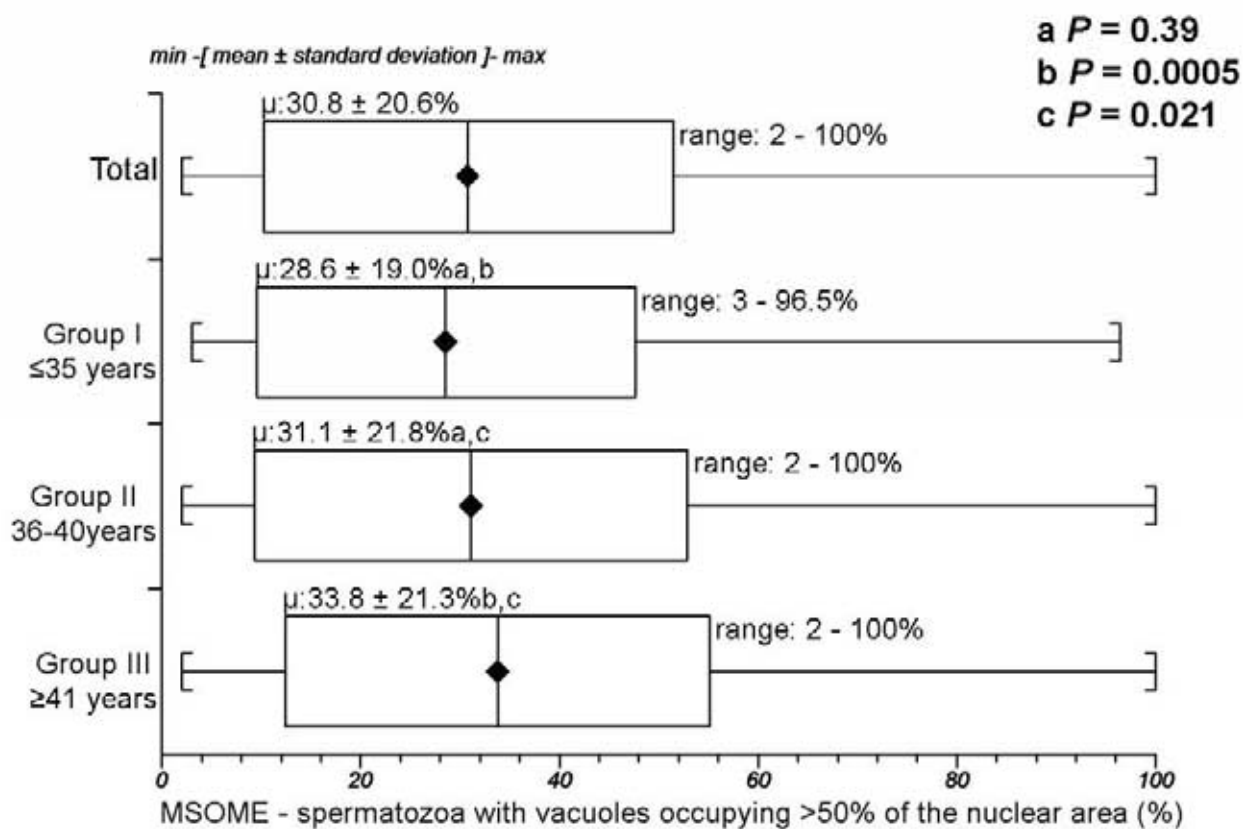


Figure 3. Percentage of spermatozoa with large nuclear vacuoles (presence of one or more vacuoles occupying >50% of the nuclear area) by MSOME according to age, comparing three age groups. There was no difference in the percentages of spermatozoa with large nuclear vacuoles in the younger (I and II) groups ($P = 0.39$, Mann–Whitney U test). The percentage of spermatozoa with large nuclear vacuoles in the older group (III) was significantly lower than those in either of the younger (I and II) groups ($P = 0.0005$ and $P = 0.021$, Mann–Whitney U test).

Regression analysis demonstrated a significant decrease in the incidence of normally formed sperm with increasing male age ($P = 0.0015$; Spearman's rank correlation $r = -0.10$) (Figure 4).

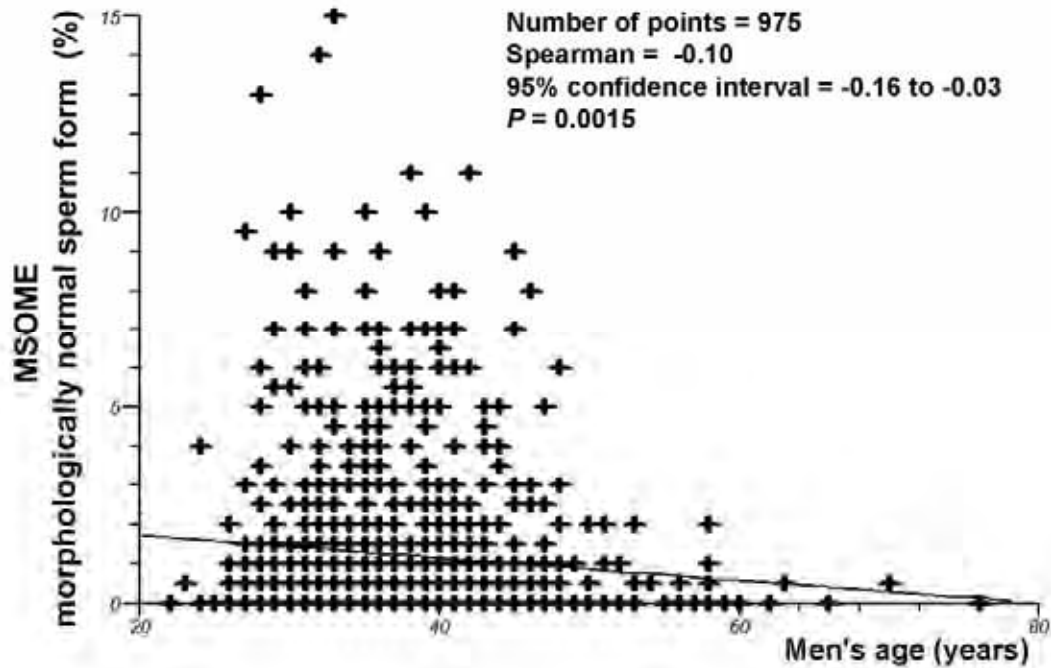


Figure 4. Relationship between male age (years) and the percentage of morphologically normal sperm, as evaluated by MSOME. Individual data points and a regression line are shown. Spearman rank correlation $r = -0.1$; $P = 0.0015$.

However, there was a significant positive correlation between the percentage of spermatozoa with large nuclear vacuoles and male age ($P = 0.0012$, Spearman rank correlation $r = 0.10$) (Figure 5).

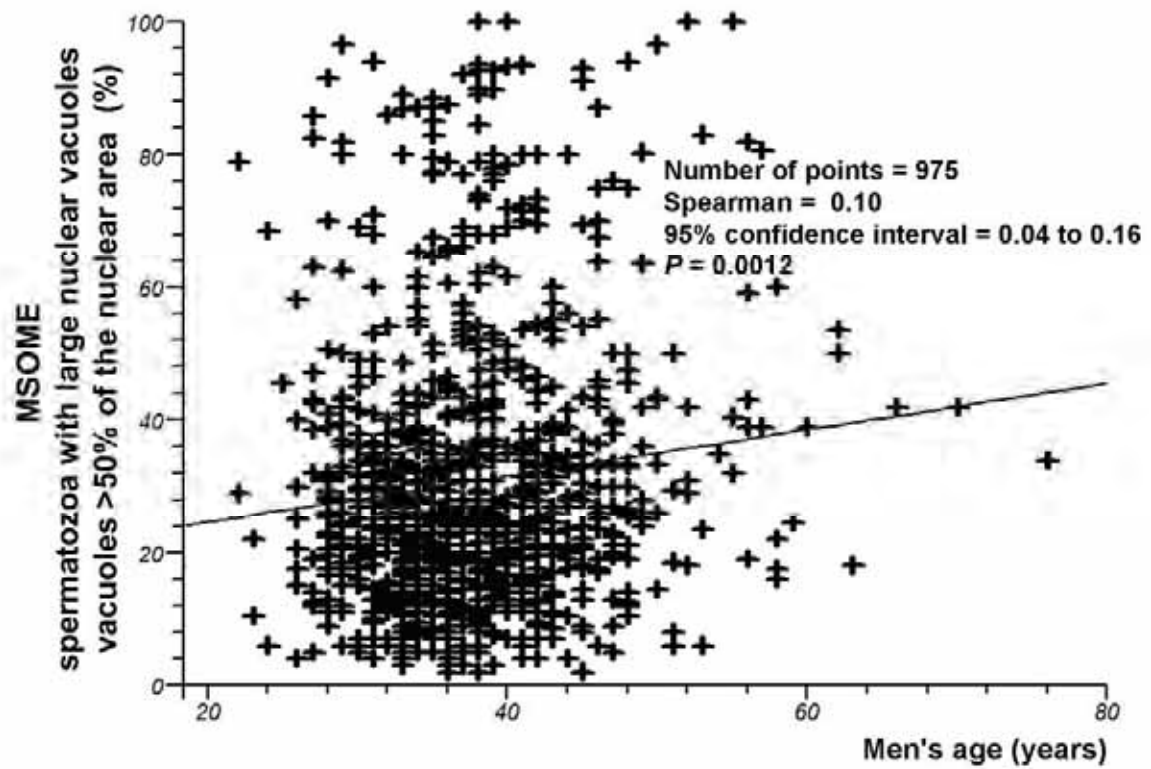


Figure 5. Relationship between male age (years) and the percentage of spermatozoa with large nuclear vacuoles (presence of one or more vacuoles occupying >50% of the nuclear area), as evaluated by MSOME. Individual data points and a regression line are shown. Spearman rank correlation $r = 0.10$; $P = 0.0012$

Discussion

Our results demonstrate that the percentage of normal spermatozoa decreases significantly ($P = 0.0015$) and the percentage of LNV spermatozoa increases significantly ($P = 0.0012$) with subject age in a large clinical sample of men undergoing infertility treatment or investigation. Unfortunately, MSOME is not typically applied beyond sperm selection. In fact, to the best of our knowledge, only Braga *et al.* [12] have analysed the relationship between sperm morphology evaluated by MSOME and patient age. In contrast to the present results, those authors found no correlation between the frequency of morphologically normal spermatozoa as defined by MSOME and male age ($P = 0.715$). However, similar to the results of this study, a positive correlation was found between male age and the presence of nuclear vacuoles (large vacuoles $P < 0.001$; small vacuoles $P < 0.001$). It should be stressed that those authors defined the MSOME criteria for the morphologic normalcy of the sperm nucleus according to Cassuto *et al.* [39], while we used the criteria proposed by Bartoov *et al.* [26]. This difference may explain the conflicting results.

Although the correlation between age and sperm morphology by MSOME was significant, it could be considered weak (Spearman's $r = -0.10$ and $r = 0.10$). However, the correlation was similar to those found by different authors using different sperm classification criteria, e.g., Brahem *et al.* [48] $r = 0.026$, not significant; Andolz *et al.* [2] $r^2 = 0.020$, $P < 0.001$; and Braga *et al.* [12] $r^2 = 0.118$ $P < 0.001$. It is likely that other factors may influence the correlation between age and morphology. Unfortunately, few studies have used this type of statistical analysis, which makes the interpretation of these correlation values challenging.

In the present analysis, significant changes in sperm morphology were observed in most men 41 years old or older. Studies using other morphological sperm evaluation criteria have shown similar results. Mladenovic *et al.* [13] conducted a prospective study of 77 semen specimens and reported that abnormal spermatozoa were found mostly in patients over 40 years of age. Jung *et al.* [7], after adjusting for duration of sexual abstinence, observed that the percentage of morphologically normal spermatozoa was significantly lower ($P < 0.01$) in older men ($n = 66$; ≥ 50 years) than in younger men ($n = 134$; 21–25 years). Girsh *et al.* [8] examined a population of 484 men and showed that sperm morphology does not begin to diminish until age 40. Zhu *et al.* [11] analysed 998 subjects and showed that the percentage of normal sperm began to decrease slowly at age 30. However, differences in the study

populations, age group cut-off points, and analysis methods prevent direct comparisons with this study's findings.

Our findings contrast with many studies that found no relationship between sperm morphology and age [48-50]. However, as noted in a review by Kidds *et al.* [50], the variation in the criteria used to analyse sperm morphology in each of these studies can explain this divergence. Some reports have associated an increase in the incidence of certain morphological abnormalities with age. Schwartz *et al.* [1] highlighted the increase in the percentage of microcephalic sperm and sperm with tail abnormalities with increasing age. Bujan *et al.* [14] observed that age is positively correlated with the percentage of microcephalic, macrocephalic, duplicate head- and coiled tailed-spermatozoa and negatively correlated with the percentage of tailless spermatozoa. Centola *et al.* [4] demonstrated that the percentage of spermatozoa with tail defects and tapered heads showed a significant positive correlation with age (i.e., defects increased as age increased). Thus, differences in criteria are especially important considering that the count of specific abnormalities may differ depending on the classification used. Kidds *et al.* [50] cites the example that the WHO criteria [46] include more tail abnormalities than do the David criteria [14] and also generally include different head abnormalities. On the other hand, MSOME places particular importance on the fine sperm nuclear morphology. Nevertheless, our data are consistent with several other studies that used criteria other than MSOME [1-3, 8, 11, 13].

The choice to analyse the percentage of LNV sperm in this study was motivated by the clinical implications of this phenotype. One plausible explanation for increased frequency of spontaneous abortions, autosomal dominant disorders, aneuploidies, and other diseases is that older men may produce more spermatozoa with damaged DNA [51]. In fact, chromatin damage has been associated with male infertility and problems with conception and sustained pregnancy [52-56]. Furthermore, there is growing evidence associating sperm DNA damage with the risk of developmental abnormalities [22, 23]. Bartoov *et al.* [26] and Berkovitz *et al.* [44], based on electron microscopy data, assumed that nuclear vacuoles indicate abnormal chromatin. Other studies confirmed the association between nuclear vacuoles at high magnification and chromatin damage. Berkovitz *et al.* [40] graded the severity of nuclear morphological defects, principally highlighting the presence of large vacuoles and suggesting that the vacuolisation of the sperm nucleus reflects some underlying chromosomal or DNA defect. Garolla *et al.* [32] showed that the presence of nuclear vacuoles affects mitochondrial function, chromatin status, and aneuploidy rate. Franco *et al.* demonstrated an association between large nuclear vacuoles and both DNA fragmentation and denaturation in the

spermatozoa [31, 34] and an association between large nuclear vacuoles and abnormal chromatin packaging [31, 34]. Moreover, Oliveira et al. [29] and Wilding et al. [36] associated the presence and extent of nuclear vacuoles with DNA damage. As reported by other authors, the present study also observed an increase in sperm DNA fragmentation that was directly related to increased patient age. Therefore, these data indirectly confirm the previously described correlation between the presence of LNVs and DNA damage.

The accuracy with which the morphological normality of spermatozoa can be assessed depends on the resolving power of the optical magnification system. Spermatozoa that appear morphologically normal at 1000x magnification may in fact carry various structural abnormalities that can only be detected at higher magnifications (>6000x). The improvement in observation is mainly due to the replacement of Hoffman modulation contrast with the Nomarski interferential modulation contrast. Thus, the use of MSOME may represent a potential improvement in the morphological analysis of the sperm. The resolving power offered by MSOME enables the identification of spermatozoa with intranuclear vacuoles that would not be detected with more conventional evaluation methods. For example, Bar-Chama *et al.* [57], employing the Tygerberg criteria, analysed the number of sperm vacuoles in a series of 1295 fresh post-processed sperm samples. They found vacuolated nuclei in only 19.5% (253) of the total analysed sperm; 80.5% (1042) had no vacuoles. On the other hand, MSOME revealed averages from 30–40% [40] to >90% [29] of spermatozoa with vacuolated nuclei.

Bartoov *et al.* [26] emphasised that, while routine morphological examination is applied in semen samples as a whole, MSOME concentrates only on the motile fraction of spermatozoa. Because some morphological defects, such as large vacuoles, can be revealed during sperm movement, motility provides an advantage for morphological observation [44]. Furthermore, the analysis of only motile spermatozoa by MSOME has an additional advantage in that it will provide information on the sample fraction with greater real fertilisation and development potential. Even though other analytic criteria can employ high magnification observation, the procedures used (fixation and staining) do not allow the selective analysis of the motile portion alone.

In summary, the results of this study clearly demonstrate a consistent decline in semen quality, in terms of morphology judged by MSOME (i.e., a decrease in percentage of normal spermatozoa and a concomitant increase in the percentage of LNV spermatozoa), with an increase in patient age in an infertile population. Considering the relationship between nuclear vacuoles and DNA damage, these age-related changes suggest that advanced paternal

age may be associated with an increased risk of unsuccessful and abnormal pregnancy as a consequence of fertilisation with damaged spermatozoa. This information may be useful in the medical management of male infertility. Based on clinical/laboratory findings on the repercussions of possible DNA damage in offspring [58], and given that sperm nuclear vacuoles can be evaluated more precisely at high magnification by MSOME [26], the present results support the routine use of MSOME for ICSI and as a criterion for semen analysis with potential clinical repercussions.

Authors' contributions

LFIS designed and coordinated the study. All authors were responsible for data collection, analysis, and interpretation presented in the manuscript. LFIS, JBAO, CGP and JGF performed the statistical analyses and wrote the manuscript; JGF reviewed the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Conflicts of Interests

The authors declare that they have no competing interests.

Acknowledgements

The authors wish to thank the American Journal Experts for revising the English text.

References

1. Schwartz D, Mayaux MJ, Spira A, Moscato ML, Jouannet P, Czyglik F, David G: **Semen characteristics as a function of age in 833 fertile men.** *Fertil Steril* 1983, **39**:530-535.
2. Andolz P, Bielsa MA, Vila J: **Evolution of semen quality in North-eastern Spain: a study in 22,759 infertile men over a 36 year period.** *Hum Reprod* 1999, **14**:731-735.
3. Auger J, Kunstmann JM, Czyglik F, Jouannet P: **Decline in semen quality among fertile men in Paris during the past 20 years.** *N Engl J Med* 1995, **332**:281-285.
4. Centola GM, Eberly S: **Seasonal variations and age-related changes in human sperm count, motility, motion parameters, morphology, and white blood cell concentration.** *Fertil Steril* 1999, **72**:803-808.
5. Ford WC, North K, Taylor H, Farrow A, Hull MG, Golding J: **Increasing paternal age is associated with delayed conception in a large population of fertile couples: evidence for declining fecundity in older men. The ALSPAC Study Team (Avon Longitudinal Study of Pregnancy and Childhood).** *Hum Reprod* 2000, **15**:1703-1708.
6. de la Rochebrochard E, Thonneau P: **Paternal age and maternal age are risk factors for miscarriage; results of a multicentre European study.** *Hum Reprod* 2002, **17**:1649-1656.
7. Jung A, Schuppe HC, Schill WB: **Comparison of semen quality in older and younger men attending an andrology clinic.** *Andrologia* 2002, **34**:116-122.
8. Girsh E, Katz N, Genkin L, Girtler O, Bocker J, Bezdin S, Barr I: **Male age influences oocyte-donor program results.** *J Assist Reprod Genet* 2008, **25**:137-143.
9. Klonoff-Cohen HS, Natarajan L: **The effect of advancing paternal age on pregnancy and live birth rates in couples undergoing in vitro fertilization or gamete intrafallopian transfer.** *Am J Obstet Gynecol* 2004, **191**:507-514.
10. Cocuzza M, Athayde KS, Agarwal A, Sharma R, Pagani R, Lucon AM, Srougi M, Hallak J: **Age-related increase of reactive oxygen species in neat semen in healthy fertile men.** *Urology* 2008, **71**:490-494.
11. Zhu QX, Meads C, Lu ML, Wu JQ, Zhou WJ, Gao ES: **Turning point of age for semen quality: a population-based study in Chinese men.** *Fertil Steril* 2011, **96**:572-576.
12. de Almeida Ferreira Braga DP, Setti AS, Figueira RC, Nichi M, Martinhago CD, Iaconelli A, Jr., Borges E, Jr.: **Sperm organelle morphologic abnormalities: contributing factors and effects on intracytoplasmic sperm injection cycles outcomes.** *Urology* 2011, **78**:786-791.
13. Mladenovic I, Micic S, Papic N, Genbacev O, Marinkovic B: **Sperm morphology and motility in different age populations.** *Arch Androl* 1994, **32**:197-205.
14. Bujan L, Mieusset R, Mondinat C, Mansat A, Pontonnier F: **Sperm morphology in fertile men and its age related variation.** *Andrologia* 1988, **20**:121-128.
15. Nybo Andersen AM, Hansen KD, Andersen PK, Davey Smith G: **Advanced paternal age and risk of fetal death: a cohort study.** *Am J Epidemiol* 2004, **160**:1214-1222.
16. Slama R, Bouyer J, Windham G, Fenster L, Werwatz A, Swan SH: **Influence of paternal age on the risk of spontaneous abortion.** *Am J Epidemiol* 2005, **161**:816-823.
17. Kleinhaus K, Perrin M, Friedlander Y, Paltiel O, Malaspina D, Harlap S: **Paternal age and spontaneous abortion.** *Obstet Gynecol* 2006, **108**:369-377.
18. Fisch H, Hyun G, Golden R, Hensle TW, Olsson CA, Liberson GL: **The influence of paternal age on down syndrome.** *J Urol* 2003, **169**:2275-2278.

19. Glaser RL, Broman KW, Schulman RL, Eskenazi B, Wyrobek AJ, Jabs EW: **The paternal-age effect in Apert syndrome is due, in part, to the increased frequency of mutations in sperm.** *Am J Hum Genet* 2003, **73**:939-947.
20. Lambert SM, Masson P, Fisch H: **The male biological clock.** *World J Urol* 2006, **24**:611-617.
21. Reichenberg A, Gross R, Weiser M, Bresnahan M, Silverman J, Harlap S, Rabinowitz J, Shulman C, Malaspina D, Lubin G, et al: **Advancing paternal age and autism.** *Arch Gen Psychiatry* 2006, **63**:1026-1032.
22. Wyrobek AJ, Eskenazi B, Young S, Arnheim N, Tiemann-Boege I, Jabs EW, Glaser RL, Pearson FS, Evenson D: **Advancing age has differential effects on DNA damage, chromatin integrity, gene mutations, and aneuploidies in sperm.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006, **103**:9601-9606.
23. Schmid TE, Eskenazi B, Baumgartner A, Marchetti F, Young S, Weldon R, Anderson D, Wyrobek AJ: **The effects of male age on sperm DNA damage in healthy non-smokers.** *Hum Reprod* 2007, **22**:180-187.
24. Kruger TF, Van der Merwe F, Van Waart J: **The Tygerberg strict criteria: what are the clinical thresholds for in vitro fertilization, intrauterine insemination, and in vivo fertilization?** In *Atlas of Human Sperm Morphology Evaluation*. Edited by Kruger TF, Franken DR. London: Taylor and Francis; 2004: 13–18
25. van der Merwe FH, Kruger TF, Oehninger SC, Lombard CJ: **The use of semen parameters to identify the subfertile male in the general population.** *Gynecol Obstet Invest* 2005, **59**:86-91.
26. Bartoov B, Berkovitz A, Eltes F, Kogosowski A, Menezes Y, Barak Y: **Real-time fine morphology of motile human sperm cells is associated with IVF-ICSI outcome.** *J Androl* 2002, **23**:1-8.
27. Bartoov B, Berkovitz A, Eltes F, Kogosovsky A, Yagoda A, Lederman H, Artzi S, Gross M, Barak Y: **Pregnancy rates are higher with intracytoplasmic morphologically selected sperm injection than with conventional intracytoplasmic injection.** *Fertil Steril* 2003, **80**:1413-1419.
28. Antinori M, Licata E, Dani G, Cerusico F, Versaci C, d'Angelo D, Antinori S: **Intracytoplasmic morphologically selected sperm injection: a prospective randomized trial.** *Reprod Biomed Online* 2008, **16**:835-841.
29. Oliveira JB, Massaro FC, Baruffi RL, Mauri AL, Petersen CG, Silva LF, Vagnini LD, Franco JG, Jr.: **Correlation between semen analysis by motile sperm organelle morphology examination and sperm DNA damage.** *Fertil Steril* 2010, **94**:1937-1940.
30. Braga DPDF, Setti AS, Figueira RCS, Nichi M, Martinhago CD, Iaconelli A, Borges E: **Sperm Organelle Morphologic Abnormalities: Contributing Factors and Effects on Intracytoplasmic Sperm Injection Cycles Outcomes.** *Urology* 2011, **78**:786-791.
31. Franco JG, Jr., Baruffi RL, Mauri AL, Petersen CG, Oliveira JB, Vagnini L: **Significance of large nuclear vacuoles in human spermatozoa: implications for ICSI.** *Reprod Biomed Online* 2008, **17**:42-45.
32. Garolla A, Fortini D, Menegazzo M, De Toni L, Nicoletti V, Moretti A, Selice R, Engl B, Foresta C: **High-power microscopy for selecting spermatozoa for ICSI by physiological status.** *Reprod Biomed Online* 2008, **17**:610-616.
33. Knez K, Zorn B, Tomazevic T, Vrtacnik-Bokal E, Virant-Klun I: **The IMSI procedure improves poor embryo development in the same infertile couples with poor semen quality: a comparative prospective randomized study.** *Reprod Biol Endocrinol* 2011, **9**:123.

34. Franco Jr JG, Mauri AL, Petersen CG, Massaro FC, Silva LF, Felipe V, Cavagna M, Pontes A, Baruffi RL, Oliveira JB, Vagnini LD: **Large nuclear vacuoles are indicative of abnormal chromatin packaging in human spermatozoa.** *Int J Androl* 2011.
35. Hazout A, Dumont-Hassan M, Junca AM, Cohen Bacrie P, Tesarik J: **High-magnification ICSI overcomes paternal effect resistant to conventional ICSI.** *Reprod Biomed Online* 2006, **12**:19-25.
36. Wilding M, Coppola G, di Matteo L, Palagiano A, Fusco E, Dale B: **Intracytoplasmic injection of morphologically selected spermatozoa (IMSI) improves outcome after assisted reproduction by deselecting physiologically poor quality spermatozoa.** *J Assist Reprod Genet* 2011, **28**:253-262.
37. Berkovitz A, Eltes F, Lederman H, Peer S, Ellenbogen A, Feldberg B, Bartoov B: **How to improve IVF-ICSI outcome by sperm selection.** *Reprod Biomed Online* 2006, **12**:634-638.
38. Vanderzwalmen P, Hiemer A, Rubner P, Bach M, Neyer A, Stecher A, Uher P, Zintz M, Lejeune B, Vanderzwalmen S, et al: **Blastocyst development after sperm selection at high magnification is associated with size and number of nuclear vacuoles.** *Reprod Biomed Online* 2008, **17**:617-627.
39. Cassuto NG, Bouret D, Plouchart JM, Jellad S, Vanderzwalmen P, Balet R, Larue L, Barak Y: **A new real-time morphology classification for human spermatozoa: a link for fertilization and improved embryo quality.** *Fertil Steril* 2009, **92**:1616-1625.
40. Berkovitz A, Eltes F, Ellenbogen A, Peer S, Feldberg D, Bartoov B: **Does the presence of nuclear vacuoles in human sperm selected for ICSI affect pregnancy outcome?** *Hum Reprod* 2006, **21**:1787-1790.
41. Balaban B, Yakin K, Alatas C, Oktem O, Isiklar A, Urman B: **Clinical outcome of intracytoplasmic injection of spermatozoa morphologically selected under high magnification: a prospective randomized study.** *Reprod Biomed Online* 2011.
42. Oliveira JB, Cavagna M, Petersen CG, Mauri AL, Massaro FC, Silva LF, Baruffi RL, Franco JG, Jr.: **Pregnancy outcomes in women with repeated implantation failures after intracytoplasmic morphologically selected sperm injection (IMSI).** *Reprod Biol Endocrinol* 2011, **9**:99.
43. Sermondade N, Hafhouf E, Dupont C, Bechoua S, Palacios C, Eustache F, Poncelet C, Benzacken B, Levy R, Sifer C: **Successful childbirth after intracytoplasmic morphologically selected sperm injection without assisted oocyte activation in a patient with globozoospermia.** *Hum Reprod* 2011, **26**:2944-2949.
44. Berkovitz A, Eltes F, Yaari S, Katz N, Barr I, Fishman A, Bartoov B: **The morphological normalcy of the sperm nucleus and pregnancy rate of intracytoplasmic injection with morphologically selected sperm.** *Hum Reprod* 2005, **20**:185-190.
45. Cassuto NG, Hazout A, Benifla JL, Balet R, Larue L, Viot G: **Decreasing birth defect in children by using high magnification selected spermatozoon injection.** *Fertil Steril* 2011, **96**:S85.
46. *WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen.* 5th ed. edn. [Geneva]: World Health Organization; 2010.
47. ASTM: **Standart E1951-02 Physical and mechanical testing standards.** West Conshohocken, PA 2007, doi:10.1520/E1951-02-R07, www.astm.org.
48. Brahem S, Mehdi M, Elghezal H, Saad A: **The effects of male aging on semen quality, sperm DNA fragmentation and chromosomal abnormalities in an infertile population.** *J Assist Reprod Genet* 2011, **28**:425-432.

49. Nijs M, De Jonge C, Cox A, Janssen M, Bosmans E, Ombelet W: **Correlation between male age, WHO sperm parameters, DNA fragmentation, chromatin packaging and outcome in assisted reproduction technology.** *Andrologia* 2011, **43**:174-179.
50. Kidd SA, Eskenazi B, Wyrobek AJ: **Effects of male age on semen quality and fertility: a review of the literature.** *Fertil Steril* 2001, **75**:237-248.
51. Vagnini L, Baruffi RL, Mauri AL, Petersen CG, Massaro FC, Pontes A, Oliveira JB, Franco JG, Jr.: **The effects of male age on sperm DNA damage in an infertile population.** *Reprod Biomed Online* 2007, **15**:514-519.
52. Borini A, Tarozzi N, Bizzaro D, Bonu MA, Fava L, Flamigni C, Coticchio G: **Sperm DNA fragmentation: paternal effect on early post-implantation embryo development in ART.** *Hum Reprod* 2006, **21**:2876-2881.
53. Erenpreiss J, Spano M, Erenpreisa J, Bungum M, Giwercman A: **Sperm chromatin structure and male fertility: biological and clinical aspects.** *Asian J Androl* 2006, **8**:11-29.
54. Zini A, Libman J: **Sperm DNA damage: importance in the era of assisted reproduction.** *Curr Opin Urol* 2006, **16**:428-434.
55. Bungum M, Humaidan P, Axmon A, Spano M, Bungum L, Erenpreiss J, Giwercman A: **Sperm DNA integrity assessment in prediction of assisted reproduction technology outcome.** *Hum Reprod* 2007, **22**:174-179.
56. Menezo YJ, Hazout A, Panteix G, Robert F, Rollet J, Cohen-Bacrie P, Chapuis F, Clement P, Benkhalifa M: **Antioxidants to reduce sperm DNA fragmentation: an unexpected adverse effect.** *Reprod Biomed Online* 2007, **14**:418-421.
57. Bar-Chama N, Schiff J, Luna M, Dann B, Copperman A, Barritt J: **The level of sperm vacuoles in the fresh post-processed sperm sample significantly affects IVF cycle outcomes.** *Fertil Steril* 2007, **88**:S18.
58. Carrell DT: **Contributions of spermatozoa to embryogenesis: assays to evaluate their genetic and epigenetic fitness.** *Reprod Biomed Online* 2008, **16**:474-484.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título do Estudo: “Efeito da idade do homem na avaliação do sêmen pela motile sperm organelle morphology examination (MSOME)”

Nome do voluntário: _____

Neste momento você irá realizar o exame dos seus espermatozoides, chamado de espermograma, para investigação da infertilidade.

Neste momento você irá realizar um espermograma (exame dos seus espermatozoides) de rotina. Por isso está sendo convidado a participar de um estudo que envolve novas avaliações dos espermatozoides.

A procura de métodos para analisar a qualidade dos espermatozoides tem sido continua. Atualmente, estudos a análise da morfologia (forma) dos espermatozóides usando um grande aumento (mais de 6000 vezes), muito acima do que usualmente feito (morfologia a alta magnificação) tem afirmado ser uma técnica viável para selecionar espermatozoides saudáveis, podendo aumentar as taxas de gravidez. Essa técnica de seleção se chama motile sperm organelle morphology examination (MSOME), ainda sem tradução precisa para o português).

Por outro lado, tem sido relatado que a idade do homem tem influência na sua fertilidade, afetando a qualidade de seus espermatozoides.

Baseando-se nisso, este estudo avaliar a influência da idade na morfologia dos espermatozoides avaliada pelo motile sperm organelle morphology examination (MSOME)

procura comparar as duas técnicas de avaliação dos espermatozóides. Com isso obteremos mais informações que podem ter influência sobre o resultado final (gravidez).

Para que você possa decidir se quer participar ou não deste estudo, precisa conhecer seus benefícios, riscos e implicações.

Objetivo do estudo

Efeito da idade do homem na avaliação do sêmen pela motile sperm organelle morphology examination (MSOME)

O resultado deste estudo propiciará mais opções para classificação e seleção do semen com bons resultados, o que representará benefício para a população que necessita de tratamento de infertilidade.

Procedimentos do estudo

Se você concordar em participar deste estudo, a morfologia dos seus espermatozoides será analisada usando MSOME. Esse resultado depois será comparado com o sua idade

As avaliações serão feitas não são prejudiciais aos espermatozoides. De qualquer forma a amostra analisada não será utilizada em nenhum tratamento, sendo apenas parte dos processos de avaliação de seu caso

Métodos alternativos

Não há métodos alternativos a esses procedimentos. Contudo você pode simplesmente não querer que sua amostra seja avaliada.

Riscos

O seu tratamento será o mesmo caso você participe ou não deste estudo. A análise dos espermatozoides é parte dos procedimentos rotineiros da investigação da infertilidade e o estudo utilizará apenas os resultados dos exames.

Benefícios

Os resultados deste estudo propiciará mais opções para classificação e seleção do sêmen.

Caráter confidencial dos registros

Além da equipe de saúde que cuidará de você, seus registros médicos poderão ser consultados pela equipe de pesquisadores envolvidos. Seu nome não será revelado ainda que informações de seu registro médico sejam utilizadas para propósitos educativos ou de publicação, que ocorrerão independentemente dos resultados obtidos.

Tratamento médico em caso de danos

Todo e qualquer dano decorrente do desenvolvimento deste projeto de pesquisa, e que necessite de atendimento médico, ficará a cargo da instituição. Lembramos que não é esperado nenhum dano para a sua saúde decorrente diretamente desse estudo.

Seu tratamento e acompanhamento médico independem de sua participação neste estudo.

Custos (Ressarcimento e indenização)

Não haverá qualquer custo ou forma de pagamento para o paciente pela sua participação no estudo.

Bases da participação

É importante que você saiba que a sua participação neste estudo é completamente voluntária e que você pode recusar-se a participar ou interromper sua participação a qualquer momento sem penalidades ou perda de benefícios aos quais você tem direito. Em caso de decidir interromper sua participação no estudo, a equipe assistente deve ser comunicada e as análises relativas ao estudo serão imediatamente interrompida.

Garantia de esclarecimentos

Nós estimulamos você ou a seus familiares a fazerem perguntas a qualquer momento do estudo. Neste caso, por favor, entre em contato com a biomédica Liliane Fabio Isidoro da Silva no telefone (16) 3911-1100 ou no endereço Av João Fiusa, 689 Ribeirão Preto – São Paulo ou com qualquer médico do Centro de Reprodução Humana Professor Franco Jr

Declaração de Consentimento e Assinatura

Li as informações acima e entendi o propósito deste estudo assim como os benefícios e riscos potenciais da participação no mesmo. Tive a oportunidade de fazer perguntas e todas foram respondidas. Eu, por intermédio deste, dou livremente meu consentimento para participar neste estudo.

Entendo que meus espermatozoides serao submetidos a uma análise adicional e necessária a meu tratamento e não receberei compensação por minha participação neste estudo.

Eu recebi uma cópia assinada deste formulário de consentimento com todas as páginas adicionais rubricadas.

_____ / ____ / ____
(Assinatura do Paciente) dia mês ano

(Nome do Paciente – letra de forma)

_____ / ____ / ____
(Assinatura de Testemunha,se necessário) dia mês ano

Eu, abaixo assinado, expliquei completamente os detalhes relevantes deste estudo ao paciente indicado acima.

_____ / ____ / ____
(Assinatura da pessoa que obteve o consentimento) dia mês ano



SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
Centro de Referência da Saúde da Mulher

Comitê de Ética em Pesquisa

São Paulo, 01 de setembro de 2011.

FORMULÁRIO DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

DATA DA APROVAÇÃO: 31/08/2011


Protocolo nº: 033/11

TÍTULO DO ESTUDO: "Efeito da idade do homem na avaliação do sêmen pela *motile sperm organelle morphology examination (MSOME)*".

NOME DO INVESTIGADOR PRINCIPAL: Liliane Fabio Isidoro da Silva.

APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA

O Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Referência da Saúde da Mulher **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa e Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, tendo sido a referida aprovação constado em ata.



Dr. Jorge Yoshinori Shida
Coordenador do Comitê de Ética
em Pesquisa do CRSM



SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
Centro de Referência da Saúde da Mulher

Comitê de Ética em Pesquisa

PARECER CONSUBSTANCIADO DE PROJETO DE PESQUISA

O Protocolo de Pesquisa: "**Efeito da idade do homem na avaliação do sêmen pela motile sperm organelle morphology examination (MSOME)**", e o **Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**, foram avaliados por este Comitê de Ética em Pesquisa e considerados **APROVADOS** sem restrições.

Para tal aprovação, foram seguidas as exigências das Resoluções nacionais 196/96 e 251/97, relacionadas a pesquisas envolvendo seres humanos. No presente projeto, foram devidamente enfatizados itens que correspondem ao objetivo do Estudo e seu racional; adequação dos materiais e métodos; referência bibliográfica pertinente; responsabilidade do pesquisador na condução do estudo, bem como possibilidade de interrupção do estudo no caso do paciente julgar conveniente.

Lembramos aos senhores pesquisadores que, no cumprimento da legislação 251/97, o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) deverá receber relatórios semestrais sobre o andamento do estudo, bem como a qualquer tempo e a critério do pesquisador nos casos de relevância. Salientamos ainda, a necessidade de relatório completo ao final do Estudo. Solicitamos que este CEP seja informado quando da inclusão do primeiro paciente.

Atenciosamente

Dr. Jorge Yoshinori Shida
Coordenador do Comitê de Ética
em Pesquisa do CRSM