

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Júlio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

**IMPACTO DA IDADE PATERNA SOBRE A COMPETÊNCIA
ESPERMÁTICA**

ISADORA BUENO PESCIUTTI DE SOUZA

BOTUCATU – SP

2024

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

"Júlio de Mesquita Filho"

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

IMPACTO DA IDADE PATERNA SOBRE A COMPETÊNCIA ESPERMÁTICA

ISADORA BUENO PESCIUTTI DE SOUZA

ORIENTADOR: JOSÉ BURATINI JUNIOR
COORIENTADORA: THAISY TINO DELLAQUA

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao
Instituto de Biotecnologia, Câmpus de Botucatu, UNESP,
para obtenção de Bacharel em Ciências Biomédicas.

BOTUCATU – SP

2024

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Souza, Isadora Bueno Pesciutti de.

Impacto da idade paterna sobre a competência espermática
/ Isadora Bueno Pesciutti de Souza. - Botucatu, 2024

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Biomedicina)
- Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de
Biociências, Botucatu

Orientador: José Buratini Junior

Coorientador: Thaisy Tino Dellaqua

Capes: 20602006

1. Estresse oxidativo. 2. Infecundidade masculina.
3. Fragmentação do DNA. 4. Idade Paterna. 5. Fertilidade.

Palavras-chave: Estresse oxidativo; Fertilidade masculina;
Fragmentação do DNA; Idade paterna.

ISADORA BUENO PESCIUTTI DE SOUZA

IMPACTO DA IDADE PATERNA SOBRE A COMPETÊNCIA ESPERMÁTICA

Trabalho de Conclusão de Curso,
apresentado a Universidade Estadual
Paulista, como parte das exigências para
a obtenção do título de Bacharel, do curso
de Graduação em Ciências Biomédicas.

Botucatu, 02 de dezembro de 2024.

BANCA EXAMINADORA

Documento assinado digitalmente
 JOSE BURATINI JUNIOR
Data: 04/12/2024 06:59:04-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. José Buratini Junior
Instituto de Biociências, UNESP-Botucatu

Documento assinado digitalmente
 PATRICIA FERNANDA FELIPE PINHEIRO
Data: 04/12/2024 16:12:52-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Patricia Fernanda Felipe Pinheiro
Instituto de Biociências, UNESP-Botucatu

Wellerson Rodrigo
Scarano:18932210837

Assinado de forma digital por
Wellerson Rodrigo
Scarano:18932210837
Dados: 2024.12.04 08:29:41 -03'00'

Prof. Wellerson Rodrigo Scarano
Instituto de Biociências, UNESP-Botucatu

AGRADECIMENTOS

É com imensa gratidão que dedico este trabalho a todos que, de alguma forma, contribuíram para que este momento se tornasse realidade.

À minha família, cuja presença constante e apoio inabalável me guiaram em cada passo, com especial menção à minha querida Vó Maria. Sem vocês, essa conquista não teria sido possível.

À minha república e aos meus amigos, que foram minha família escolhida ao longo desta jornada. Vocês não só fizeram o caminho mais leve, mas também o tornaram inesquecível.

A todos os meus professores, que ao longo dos anos se dedicaram a transmitir conhecimento e enriquecer meu aprendizado.

À minha supervisora do estágio curricular, Kelly Colussi Pinheiro Precipito, expresso minha gratidão pela oportunidade de aprendizado e crescimento profissional.

Ao meu orientador, Prof. Dr. José Buratini Junior, que prontamente se empenhou junto comigo para a realização desta monografia. Um reconhecimento especial à minha coorientadora, Profa. Me. Thaisy Tino Dellaqua, pela orientação atenta e pelo apoio constante em cada etapa deste trabalho. Suas orientações e dedicação foram fundamentais para a construção deste projeto.

RESUMO

A infertilidade masculina, responsável por aproximadamente 50% dos casos de infertilidade conjugal, está frequentemente associada à fragmentação do DNA espermático, um fator subestimado em análises convencionais de sêmen. A idade paterna avançada tem sido identificada como um dos principais contribuintes para o aumento da fragmentação do DNA, mediada pelo estresse oxidativo e pela peroxidação lipídica, o que compromete a integridade e funcionalidade dos espermatozoides. Considerando o aumento do uso de tecnologias de reprodução assistida, torna-se crucial avaliar os riscos associados ao uso de espermatozoides com danos no DNA, especialmente em homens mais velhos, cujos espermatozoides podem estar mais suscetíveis à fragmentação e ao estresse oxidativo. Este estudo investigou os impactos do envelhecimento masculino na competência espermática, destacando a importância de incluir a avaliação da fragmentação do DNA como ferramenta diagnóstica em casos de infertilidade, mesmo em homens com parâmetros seminais aparentemente normais. Essa abordagem pode otimizar os desfechos nas tecnologias de reprodução assistida. Concluiu-se que o reconhecimento dos efeitos do envelhecimento masculino é essencial para um manejo mais eficaz e personalizado da fertilidade.

Palavras-chave: Idade paterna, estresse oxidativo, fragmentação do DNA, fertilidade masculina

ABSTRACT

Male infertility, responsible for approximately 50% of cases of couple infertility, is often associated with sperm DNA fragmentation, a factor underestimated in conventional semen analyses. Advanced paternal age has been identified as a key contributor to increased DNA fragmentation, driven by oxidative stress and lipid peroxidation, compromising the integrity and functionality of sperm cells. Considering the growing use of assisted reproductive technologies, it is crucial to assess the risks associated with using sperm with DNA damage, particularly in older men, whose sperm may be more susceptible to fragmentation and oxidative stress. This study investigated the impacts of male aging on sperm competence, highlighting the importance of incorporating DNA fragmentation analysis as a diagnostic tool in infertility cases, even in men with seemingly normal semen parameters. This approach may optimize outcomes in assisted reproductive technologies. It was concluded that recognizing the effects of male aging is essential for more effective and personalized fertility management.

Keywords: Paternal age, oxidative stress, DNA fragmentation, male fertility

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	6
METODOLOGIA	9
RESULTADOS E DISCUSSÃO	10
Estresse oxidativo e espermatozoides	10
Idade paterna e dano oxidativo ao DNA	14
Normozoospermia e competência espermática	17
Espermatozoides defeituosos e a tecnologia de reprodução assistida	19
CONCLUSÃO	20
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	21

INTRODUÇÃO

A infertilidade é uma condição que afeta entre 8% e 12% dos casais em idade reprodutiva em todo o mundo (VANDER BORGHTE WYNS, 2018). De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), define-se infertilidade como a ausência de concepção após 12 meses ou mais de tentativas sem contracepção. As causas dessa condição podem ser femininas, masculinas, uma combinação de ambas ou, em até 30–40% dos casos, permanecer sem explicação aparente (ISCA) (WASILEWSKI et al., 2020). O fator feminino pode estar associado a uma variedade de condições, incluindo distúrbios ovulatórios, problemas tubários, endometriose, alterações uterinas e fatores relacionados ao estilo de vida (PHILLIPS, OLANREWAJU E OMOLE, 2023). O fator masculino, por sua vez, representa cerca de 50% dos casos de infertilidade, e, apesar de uma redução nos diagnósticos idiopáticos, ainda existe uma proporção significativa de casos de origem desconhecida (AGARWAL et al., 2021).

A fertilização *in vitro* (FIV) celebrou 46 anos em 2024, desde que o primeiro bebê concebido por esta técnica nasceu em 1978. Desde então, a reprodução assistida avançou significativamente, com a introdução de novas técnicas para aprimorar as chances de sucesso nos tratamentos de infertilidade. Entre elas, a injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI), oferecendo uma alternativa para casos de infertilidade masculina severa, em que a fecundação natural ou mesmo a FIV convencional apresentam resultados limitados (SENGUPTA et al., 2024). Esta técnica avançada requer apenas um espermatozoide viável para a fecundação do gameta feminino (TANNUS et al., 2017). Embora a ICSI seja uma estratégia terapêutica eficaz para contornar os problemas que impedem a gravidez natural, é importante ressaltar que a mesma não trata as causas subjacentes que causaram a infertilidade (STEPHENS, ARNETT E MEACHAM, 2013).

O espermograma é a principal ferramenta de investigação para infertilidade masculina (TALWAR E HAYATNAGARKAR, 2015; ZHANG et al., 2014). Este exame analisa qualitativa e quantitativamente o sêmen, oferecendo uma visão detalhada dos gametas masculinos. De acordo com o manual da OMS, após a liquefação da amostra, realiza-se uma análise macroscópica, que considera o volume, pH, cor, aspecto e viscosidade do sêmen. Em seguida, procede-se à análise microscópica, que abrange a avaliação da concentração, motilidade, vitalidade, morfologia e aglutinação dos espermatozoides, além da análise da concentração de células redondas. É importante notar que amostras que não apresentam alterações significativas em seus parâmetros ainda podem ter dificuldades de fecundação (DOROFTEI et al., 2021). Testes

complementares, como a análise da fragmentação do DNA espermático, oferecem uma avaliação mais aprofundada da qualidade do sêmen e do potencial fértil do indivíduo.

Fatores genéticos, ambientais, estilo de vida, infecções, exposição a substâncias tóxicas, como agrotóxicos e metais pesados, e o avanço da idade podem culminar em estresse oxidativo, prejudicando a integridade funcional dos espermatozoides (AITKEN et al., 2016). A ideia de que o estresse oxidativo pode desempenhar um papel na etiologia da disfunção espermática surgiu a partir de um estudo em 1943 (MACLEOD, 1943). Organismos aeróbicos produzem subprodutos reativos e instáveis, conhecidos como espécies reativas de oxigênio (EROs), durante a produção de energia. As EROs incluem radicais livres, como o superóxido, e moléculas não radicais, como o peróxido de hidrogênio (DREVET E AITKEN, 2020). Essas moléculas buscam estabilidade, provocando reações em cadeia que resultam na oxidação de outras moléculas, perpetuando o processo (AITKEN, BROMFIELD E GIBB, 2022). O equilíbrio entre a produção e a neutralização de EROs é crucial para a homeostase celular, pois o acúmulo desses compostos causa o estresse oxidativo, o qual impacta negativamente a estrutura e a função celular (DREVET E AITKEN, 2020).

Embora a maioria das células gerenciam eficazmente a sinalização das EROs, os espermatozoides maduros são particularmente vulneráveis (AITKEN, JONES E ROBERTSON, 2012). Eles são altamente citodiferenciados, com a maior parte do citoplasma excluída e o material genético compactado, o que os impede de transcrever e sintetizar novas proteínas para combater o estresse oxidativo e reparar danos ao DNA (AITKEN, JONES E ROBERTSON, 2012). Esta fragilidade é agravada pela composição da membrana plasmática, rica em ácidos graxos poliinsaturados (AGPI), que são alvos principais das EROs (SENGUPTA et al., 2024). A oxidação dos AGPI gera aldeídos tóxicos que intensificam a produção de EROs, criando um ciclo vicioso que amplifica as consequências patológicas (MOAZAMIAN et al., 2015).

Outro impacto significativo do estresse oxidativo nas células espermáticas é o dano ao material genético. Esses danos podem variar desde a oxidação de bases específicas até a fragmentação do DNA, resultante de quebras de fita simples ou dupla. Em níveis intermediários de estresse oxidativo, podem ocorrer outros eventos oxidativos, como a geração de sítios abásicos e a reticulação DNA-proteína. Como os espermatozoides não têm um sistema de reparo de DNA totalmente funcional, eles dependem do sistema de reparo do oócito, especialmente da via de excisão de base (DREVET E AITKEN, 2020).

O envelhecimento paterno está associado a um aumento profundo nos danos ao DNA dos espermatozoides, bem como, a redução na fertilidade (AITKEN, 2023). Fatores como a maior expectativa de vida, as pressões sociais contemporâneas e o adiamento do casamento têm levado

muitos casais a postergarem a paternidade. Enquanto o impacto da idade materna sobre os resultados reprodutivos adversos é amplamente reconhecido, a influência da idade paterna na qualidade do sêmen e na fecundidade ainda não está completamente elucidada (GONZALEZ et al., 2022). Apesar de os homens continuarem a produzir espermatozoides ao longo do tempo, a qualidade desses gametas tende a deteriorar-se, com um aumento significativo nos danos ao DNA à medida que envelhecem (JOHNSON et al., 2015).

Embora os mecanismos que geram a fragmentação do DNA espermático relacionada à idade não sejam totalmente compreendidos, o estresse oxidativo é considerado um fator importante (NAGO et al., 2021). Em um estudo envolvendo homens férteis e inférteis, Moskovtsev et al. (2006) observaram que o DNA espermático fragmentado de homens com mais de 45 anos era cerca do dobro em relação àqueles com menos de 30 anos. Além disso, Spanò et al. (2000) relataram resultados semelhantes em um estudo com 215 homens entre 25 e 55 anos e com fertilidade incerta. Assim, a idade paterna pode ser um fator desencadeante de estresse oxidativo e danos ao DNA na linhagem germinativa masculina. No entanto, poucos estudos investigaram especificamente o dano ao DNA espermático em homens com parâmetros seminais normais. Neste sentido, o presente estudo visou compilar dados sobre o impacto da idade paterna na competência espermática afetada por EROs em homens normospermicos.

METODOLOGIA DA PESQUISA LITERÁRIA

Este estudo consistiu em uma revisão bibliográfica abrangente com foco no papel da idade paterna sobre a competência espermática. A busca por artigos foi realizada nas bases de dados Pubmed, Google Acadêmico, Scielo, Wiley e ScienceDirect, utilizando as palavras-chaves “idade paterna”, “estresse oxidativo”, “fragmentação de DNA” e “fertilidade masculina”. Artigos dos últimos 24 anos, com ênfase aos mais recentes, nos idiomas inglês e português foram incluídos nesta revisão. Estudos que não estavam diretamente relacionados ao tema ou que não atenderam aos critérios de inclusão estabelecidos foram excluídos. Por fim, os resultados foram sintetizados e apresentados de forma clara e objetiva, fornecendo uma visão abrangente do estado atual da pesquisa sobre o tema.

RESULTADOS DA LITERATURA E DISCUSSÃO

A infertilidade é uma condição multifatorial que afeta entre 8% e 12% dos casais em idade reprodutiva, sendo o fator masculino responsável por cerca de 50% dos casos (VANDER BORGHT E WYNS, 2018; AGARWAL et al., 2021). Apesar dos avanços significativos em reprodução assistida, como a inserção da técnica de ICSI que revolucionou o tratamento da infertilidade masculina severa, essas abordagens são apenas paliativas e não tratam as causas subjacentes (SENGUPTA et al., 2024; STEPHENS, ARNETT E MEACHAM, 2013). Entre os fatores etiológicos, o estresse oxidativo surge como um elemento central, resultante do desequilíbrio de EROs, que afeta diretamente a qualidade espermática por meio de danos à membrana plasmática e fragmentação do DNA espermático (AITKEN, BROMFIELD E GIBB, 2022; MOAZAMIAN et al., 2015; NAGO et al., 2021). Essa condição é agravada pela idade paterna avançada, um fator frequentemente negligenciado nos estudos de fertilidade, mas que está associado ao aumento dos danos ao DNA espermático, mesmo em homens com parâmetros seminais normais (MOSKOVITSEV et al., 2006; SPANÒ et al., 2000). Esses achados destacam a necessidade de compreender melhor os mecanismos subjacentes e de investigar estratégias para mitigar o impacto do estresse oxidativo e da idade paterna na competência espermática.

- **Estresse oxidativo e espermatozoides**

O excesso de EROs altera quimicamente componentes celulares como proteínas, lipídios, RNA e DNA, comprometendo a função celular. Os espermatozoides são especialmente suscetíveis ao estresse oxidativo por três razões principais: (i) possuem alta concentração de ácidos graxos poliinsaturados na membrana plasmática; (ii) têm deficiências naturais em enzimas antioxidantes que poderiam oferecer proteção; e (iii) apresentam uma capacidade reduzida de detectar e reparar danos no DNA. Portanto, o estresse oxidativo persistente no sistema reprodutivo masculino pode prejudicar a saúde dos espermatozoides, afetando a integridade do DNA e a fusão da membrana com o óocito (Figura 1; LEWIS et al., 2013).

As EROs, também conhecidas como radicais livres, são agentes oxidantes gerados como subprodutos do metabolismo do oxigênio. Devido ao elétron desemparelhado na camada externa, essas moléculas são altamente reativas e instáveis (HENKEL, 2011). Entre as moléculas radicais, incluem-se o radical hidroxila, ânion superóxido, óxido nítrico, além de moléculas não radicais, como o peróxido de hidrogênio (SMITH, JOHNSON E WILLIAMS, 2024). A produção

controlada de EROs, em níveis fisiológicos, desempenha papel importante em processos fisiológicos normais, como (i) capacitação, que é essencial para que os espermatozoides se tornem competentes para fertilizar o óvulo, (ii) reação acrossômica; e (iii) fusão espermatozoide-oócito (WAGNER, CHENG, E KO, 2018). Todavia, estudos indicam que altos níveis de estresse oxidativo podem tornar os espermatozoides incapazes de fertilizar (AITKEN et al., 2003).

A geração de EROs em espermatozoides pode ocorrer de duas formas: através do sistema nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) oxidase na membrana plasmática dos espermatozoides e/ou por meio da reação oxido-redutase dependente de nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD) nas mitocôndrias. Este último mecanismo parece ser a principal fonte de EROs, pois os espermatozoides são ricos em mitocôndrias, que fornecem energia necessária para sua motilidade (HENKEL, 2011). Assim, a presença de espermatozoides disfuncionais no sêmen eleva significativamente a produção de EROs, o que, por sua vez, compromete a função mitocondrial e, consequentemente, a função espermática.

As EROs presentes no plasma seminal têm origem em diversas fontes, tanto endógenas quanto exógenas. Entre as principais fontes endógenas, destacam-se os leucócitos, especialmente os neutrófilos e macrófagos, além de espermatozoides imaturos. O estresse oxidativo resultante desse quadro pode levar a condições patológicas, como a peroxidação lipídica, danos ao DNA e apoptose (AGARWALL et al., 2014). Durante a espermatogênese, os espermatozoides em desenvolvimento eliminam parte de seu citoplasma para se prepararem para a fecundação. No entanto, espermatozoides danificados podem reter um excesso de citoplasma na região da peça intermediária, o que ocorre devido a uma interrupção na espermiogênese, uma condição conhecida como excesso de citoplasma residual (ERC), que ativa o sistema NADPH através do desvio da via do hexose monofosfato. Essa via é utilizada como fonte de elétrons para a produção de EROs e, potencialmente, estresse oxidativo (RENGAN et al., 2012). Assim, o ERC prejudica o potencial de fecundação, contribuindo para a infertilidade (HAMPL et al., 2012).

Os leucócitos peroxidase-positivos, como os polimorfonucleares e macrófagos, têm sua origem, em grande parte, na próstata e nas vesículas seminais (SALEH et al., 2003). Quando essas fontes de EROs são ativadas por estímulos intracelulares ou extracelulares, como infecções ou inflamações, podem liberar até 100 vezes mais EROs do que o habitual, além de aumentar a produção de NADPH por meio do desvio da via do hexose monofosfato (LAVRANOS et al., 2012; AGARWALL E SAID, 2003). Um aumento nas citocinas pró-inflamatórias, como a interleucina (IL)-8, em combinação com uma redução na superóxido dismutase antioxidante (SOD), pode desencadear uma explosão respiratória, resultando em altos níveis de EROs e, consequentemente, estresse oxidativo. Esse estresse pode causar danos aos espermatozoides

quando as concentrações de leucócitos no plasma seminal estão anormalmente elevadas, como no caso da leucocitospermia (LU et al., 2010). Estudos mostraram uma correlação entre a diminuição da função espermática e a presença de níveis elevados de EROs, IL-6, IL-8 e fator de necrose tumoral no plasma seminal, todos contribuindo para um aumento na peroxidação lipídica (LPO) da membrana celular espermática (LAVRANOS et al., 2012).

A membrana plasmática dos espermatozoides é caracterizada pela presença abundante do ácido docosahexaenóico (DHA), um ácido graxo poliinsaturado. O DHA possui seis duplas ligações não conjugadas, separadas por grupos metileno em sua estrutura, tornando-o suscetível ao ataque dos radicais livres. A colocação de uma ligação dupla adjacente a um grupo metileno enfraquece a ligação metil carbono-hidrogênio, tornando o hidrogênio extremamente suscetível à abstração pelas EROs, o que inicia a peroxidação lipídica em níveis elevados de EROs. Isso culmina na formação de aldeídos lipídicos eletrofílicos, como 4-hidroxinonenal (4HNE), acroleína e malondialdeído, que são altamente reativos e potencialmente tóxicos. À medida que a cascata LPO prossegue no espermatozoide, quase 60% do ácido graxo é perdido da membrana, afetando sua função ao diminuir a fluidez, aumentar a permeabilidade não específica a íons e inativar receptores e enzimas ligados à membrana, fatores estes associados à fecundação anormal (TREMELLEN, 2008; MAKKER et al., 2009; AITKEN et al., 2010; AITKEN et al., 2014).

A cromatina no núcleo dos espermatozoides é suscetível a danos oxidativos, resultando em alterações nas bases e fragmentação do DNA (ZRIBI et al., 2011). A cromatina dos espermatozoides humanos possui uma estrutura altamente compacta e organizada. Durante a espermiogênese, as histonas são substituídas por proteínas de transição e, em seguida, por protaminas. Essas protaminas compactam os filamentos de DNA, formando a unidade básica de empacotamento da cromatina espermática, conhecida como toroide. Os toroides são ainda mais compactados por ligações cruzadas de dissulfeto intra e intermoleculares, o que contribui para a proteção da cromatina contra danos oxidativos, tornando os espermatozoides particularmente resistentes a lesões no DNA (SCHULTE et al. 2010).

Entretanto, em situações de compactação inadequada e protaminação incompleta, o DNA torna-se mais suscetível ao estresse oxidativo. Danos no DNA foram detectados em espermatozoides de diferentes locais, como testículos, epidídimos e no ejaculado (DURU, MORSHEDI E OEHNINGER, 2000). Quebras de fita simples são um resultado direto do dano oxidativo no DNA dos espermatozoides, enquanto quebras de fita dupla podem ocorrer devido à exposição ao 4HNE, um importante produto da LPO (BADOUARD et al., 2008). Dois principais adutos de DNA foram identificados: 8-hidroxi-2-desoxiguanosina (8-OHdG) e dois etenonucleosídeos (1, N6-etenoadenosina e 1, N6-etenoguanosina), ambos considerados

biomarcadores significativos de danos ao DNA induzidos por estresse oxidativo (GONZÁLEZ-MARIN E GONSÁLVEZ, 2012; VALAVANIDIS, VLACHOGIANNI E FIOTAKIS, 2009).

Em 1976, um ensaio de penetração de oócito de hamster introduziu um método objetivo para avaliar a competência dos espermatozoides humanos em fecundar o oócito, expandindo a análise funcional para além da motilidade (YANAGIMACHI, WINKELHAKE E NICOLSON, 1976). Este estudo sugeriu a presença de defeitos na membrana plasmática de espermatozoides funcionalmente comprometidos, dificultando sua fusão com os oócitos. Isso levou à investigação da peroxidação lipídica, que prejudica a interação entre espermatozoide e oócito, afetando processos como a capacitação e a reação acrossômica, essenciais para a fecundação (AITKEN, 2017; O'FLAHERTY, 2015; AITKEN et al., 2016). Aitken et al. (1998) mostraram o impacto do estresse oxidativo na fusão espermatozoide e oócito, onde níveis baixos de estresse oxidativo aumentaram as taxas de fusão. No entanto, em níveis elevados, observou-se um aumento na peroxidação lipídica e uma diminuição nas taxas de fusão (AITKEN et al., 1998). Esse fenômeno pode ser explicado pelo dano oxidativo direto às proteínas envolvidas na fusão, em vez de alterações na fluidez da membrana plasmática do espermatozoide (CHRISTOVA, JAMES e JONES, 2004).

Uma proporção significativa de homens com infertilidade inexplicada apresenta causas atribuíveis a testes genômicos do espermatozoide (BUNGUM et al., 2007). Há uma correlação significativa entre a formação do aduto oxidado (8-OHdG) e o dano ao DNA, indicando que o material genético dos espermatozoides pode estar sofrendo lesões induzidas pela oxidação (IULIIS et al., 2009; SANTISO et al., 2010).

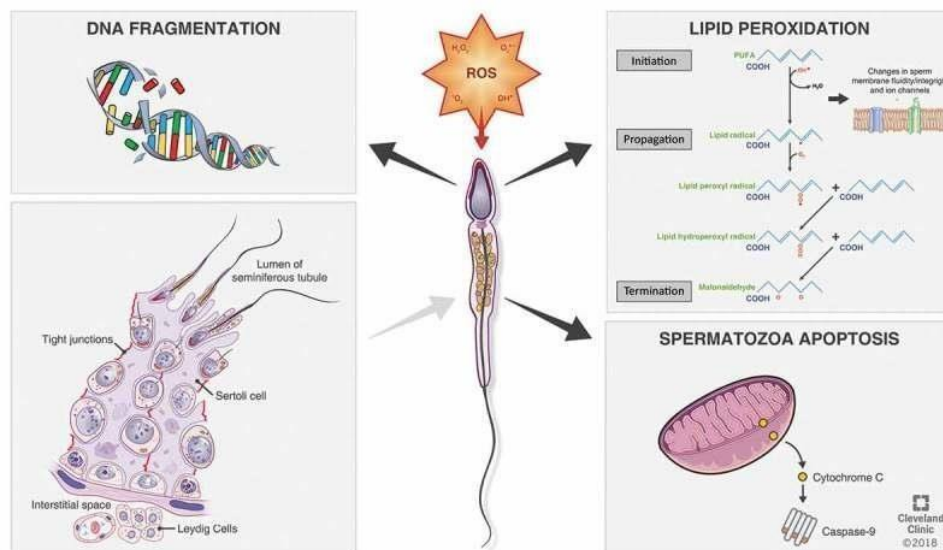


Figura 1: Efeitos das espécies reativas de oxigênio na qualidade espermática. As EROs causam fragmentação do DNA, peroxidação lipídica na membrana (reduzindo fluidez e funcionalidade) e ativam vias apoptóticas (DUTTA et al., 2019).

- **Idade paterna e dano oxidativo ao DNA**

Nas últimas décadas, estudos demonstraram que altos níveis de fragmentação do DNA em espermatozoides humanos podem representar uma ameaça significativa à fertilidade masculina (RIBAS-MAYNOU et al., 2021). Já foi relatado a associação entre a idade paterna e a incidência de danos ao DNA espermático (VARSHINI et al., 2012). Embora o mecanismo pelo qual a idade afeta o DNA espermático ainda não esteja totalmente esclarecido, o estresse oxidativo é considerado um fator relevante (AITKEN et al., 2010).

O avanço da idade causa um acúmulo de EROs no organismo, promovendo a peroxidação lipídica e, conseqüentemente, o estresse oxidativo. Uma quantidade excessiva de EROs e redução da capacidade antioxidante no curso do envelhecimento podem induzir dano oxidativo ao DNA e apoptose (AITKEN, 1989). Acredita-se que o ataque de radicais livres contribua para o aumento da fragmentação, tanto nos testículos quanto em locais pós-testiculares (GRECO et al., 2005; MOSKOVITSEV et al., 2010). Além de causar quebras diretas no DNA, um comprometimento na maturação da cromatina poderia produzir núcleos mal compactados, que são mais vulneráveis ao ataque oxidativo (AITKEN et al., 2013). Os radicais livres também podem ativar vias apoptóticas, induzindo a ação de caspases e nucleases, como ocorre em células somáticas (SINHA et al., 2013).

Homens de idade avançada tendem a produzir maior número de espermatozoides com alterações, incluindo fragmentação do DNA. Com o envelhecimento, a eficiência do sistema de defesa antioxidante e dos mecanismos de reparo do DNA diminui, o que resulta em níveis elevados de EROs e DNA fragmentado (NGUYEN-POWANDA E ROBAIRE, 2020). A descondensação da cromatina do DNA espermático, associada ao avanço da idade paterna, foi sugerida como um mecanismo subjacente ao aumento das taxas de fragmentação do DNA. Especificamente, a descondensação expõe o DNA a EROs geradas por diversas fontes, incluindo a disfunção mitocondrial (KAAROUCH et al., 2018; PETERSEN et al., 2018).

Conseqüentemente, os danos ao DNA presentes em espermatozoides maduros refletem células germinativas que, de alguma forma, escaparam da eliminação apoptótica no epitélio germinativo ou, mais provavelmente, células que sofreram danos durante sua passagem pelo trato

reprodutivo masculino após a fase testicular (ESTEVEZ et al., 2018; DE IULLIS et al., 2009). A avaliação de quebras de fita dupla ou simples pode fornecer informações importantes durante a avaliação da fertilidade dos homens (GAROLLA et al., 2015; AGARWALL et al., 2020).

Embora os espermatozoides maduros sejam capazes de iniciar o reparo do DNA por meio da 8-oxoguanina DNA glicosilase 1 (OGG1), a continuidade desse reparo depende dos oócitos, uma vez que os espermatozoides carecem de componentes essenciais para completar a via de reparo por excisão de bases (BER) que são fornecidos pelo gameta feminino, assegurando a capacidade total de reparo do DNA no zigoto (AITKEN et al., 2013; RIBAS-MAYNOU e BENET, 2019; MARCHETTI et al., 2015). Nguyen-Powanda e Robaire (2021) avaliaram os efeitos do envelhecimento e da remoção da SOD1 em células germinativas masculinas de camundongos SOD1-nulos (*Sod1*^{-/-}), afim de identificar os mecanismos potenciais de danos ao DNA nessas células. A análise imuno-histoquímica revelou um aumento na peroxidação lipídica e danos ao DNA nas células germinativas de camundongos selvagens (WT) e *Sod1*^{-/-} envelhecidos de todas as idades. Além disso, a imunocoloração da OGG1, marcador da via BER, aumentou em camundongos WT envelhecidos e *Sod1*^{-/-} jovens. Os resultados indicam que o envelhecimento aumenta a resposta de reparo ao aumento do dano oxidativo ao DNA, enquanto deficiências em outros mecanismos de reparo de DNA podem contribuir para o aumento do dano ao DNA, tanto pelo envelhecimento quanto pela perda de SOD1.

Danos à cromatina espermática, como a fragmentação de DNA (KIDD, et al. 2001; VIRRO, et al. 2004) foram associados à fertilidade masculina e aumentam com a idade (BONDE et al., 2002). Um estudo mostrou que, em relação ao índice de fragmentação do DNA (DFI), a probabilidade prevista de ter valores anormais foi <5% aos 30 anos, ≈35% aos 50 anos e 95% aos 80 anos, em uma coorte não clínica de 97 homens não fumantes e sem problemas de fertilidade (WYROBEK et al., 2006). Esse estudo também revelou que a proporção de homens com valores anormais de DFI aumentou entre as categorias de idade, e em todos os homens acima de 70 anos. Não foram detectadas evidências de limites de idade, sugerindo uma tendência crescente na frequência média de espermatozoides com fragmentação de DNA, iniciada nos primeiros anos reprodutivos, onde os valores médios de DFI duplicam entre os 20 e 60 anos e continuam a aumentar progressivamente com a idade. Nesse contexto, Moskovtsev et al. (2006) observaram que o DFI foi alto (≥30%) em homens mais velhos, correspondendo a um potencial de fertilidade razoável a ruim, enquanto em faixas etárias mais jovens o DFI foi moderado (>15% a <30%), correspondendo a um bom potencial de fertilidade. A fragmentação do DNA foi significativamente menor em todas as faixas etárias em comparação com homens com mais de

45 anos, com DFI dobrando em homens com 45 anos ou mais em comparação com aqueles com menos de 30 anos (32,0% e 15,2%, respectivamente).

A relação entre o envelhecimento paterno e o dano oxidativo ao DNA em camundongos propensos à senescência acelerada 8 (SAMP8) foi relatada no estudo de Smith et al. (2013). Essa linhagem de camundongo contém um conjunto de mutações naturais resultando em um fenótipo de senescência acelerada, mediado por estresse oxidativo. Esse processo é intensificado por uma mutação no gene *Ogg1*, que reduz a eficiência da enzima em remover adutos de 8OHdG. A análise do fenótipo reprodutivo dos machos SAMP8 revelou um alto nível de danos ao DNA em espermatozoides epididimários caudais, detectado pelo ensaio do cometa alcalino. Além disso, essas lesões foram confirmadas como sendo de natureza oxidativa, conforme demonstrado por aumentos significativos na formação de aduto 8OHdG no tecido testicular SAMP8 e em espermatozoides maduros em relação a uma cepa de controle.

Petersen et al. (2018) demonstraram que a fragmentação do DNA espermático aumentou com a idade. Pacientes com idade ≤ 35 anos apresentaram níveis estatisticamente menores de dano ao DNA (14,7%) quando comparados a homens com idade entre 36-44 anos (15,9%) e aqueles ≥ 45 anos (16,2%). Paralelamente, o empacotamento anormal da cromatina diminuiu com o avanço da idade, sendo mais frequente em homens ≤ 35 anos (57,7%) do que em faixas etárias superiores (55,7% e 52,9%, respectivamente). O dano mitocondrial também se intensificou com a idade: pacientes com idade ≤ 35 anos apresentaram menor proporção de potencial de membrana mitocondrial (MMP) anormal (24,6%) em comparação com aqueles entre 36-44 anos (25,6%) e ≥ 45 anos (29,0%). Já foi demonstrado que as mitocôndrias espermáticas produzem EROS, desencadeando estresse oxidativo, desempenhando um papel fundamental na fisiopatologia reprodutiva relacionada à idade (KOPPERS et al., 2008). O aumento da produção de EROS foi associado à permeabilidade alterada da membrana mitocondrial com uma provável perda subsequente de MMP, culminando com o DNA oxidado (AITKEN et al., 2012; AGARWALL et al., 2014).

Um estudo realizado por Evenson et al. (2020) mostrou que pacientes de 20 a 25 anos apresentam um DFI médio de $\sim 12\%$. Entre 40 e 45 anos, a %DFI aumenta para $\sim 19\%$, indicando uma redução do potencial de fertilidade, especialmente se um ou mais parâmetros clássicos do sêmen estiverem anormais. Na faixa etária de 60 a 65 anos, o DFI médio quase dobra, alcançando um patamar patológico de $\sim 37\%$. O estudo também sugeriu orientações para a prática clínica em tecnologias de reprodução assistida. A fecundação natural e a inseminação intrauterina provavelmente são bem-sucedidas com $< 25\%$ DFI, enquanto pacientes com $> 25\text{--}30\%$ DFI devem ser direcionados para a fecundação por ICSI. Em casos de DFI $> 40\%$ DFI, comumente

visto em homens com mais de 50 anos de idade, pode ser necessário considerar a aspiração de espermatozoide testicular (TESA), embora essa abordagem seja ainda controversa. Esses dados sugerem que o aumento progressivo do DFI com a idade, especialmente entre 40 e 50 anos, representa um fator significativo de infertilidade para casais, independentemente do estilo de vida do homem. Lu et al. (2018) concluiu que o DFI em homens com idade ≤ 35 anos é significativamente menor em comparação com homens entre 36-39 anos e acima de 40 anos, indicando que a proporção de espermatozoides com danos no DNA aumenta com a idade. Além disso, tais achados sugerem que a idade fértil ideal para homens ocorre antes dos 35 anos.

Danos oxidativos intensos ao DNA em células germinativas que entram na meiose normalmente desencadeiam a apoptose (AITKEN et al., 2011). No entanto, níveis mais brandos de estresse oxidativo podem ativar mecanismos compensatórios na linhagem germinativa que favorecem a sobrevivência da prole. Um exemplo de tal efeito é o impacto do envelhecimento paterno sobre o comprimento do telômero (AITKEN, 2023). Como discutido, o envelhecimento está associado ao aumento do estresse oxidativo na linhagem germinativa. Uma das respostas adaptativas da linhagem germinativa a esse estresse é a regulação positiva da atividade da telomerase, o que leva ao aumento do comprimento dos telômeros nos espermatozoides (ASTON et al., 2012). Por outro lado, quando ocorre estresse oxidativo após a meiose, situação em que a telomerase não pode mais atuar, o comprimento dos telômeros nos espermatozoides tende a ser anormalmente curto, tipicamente observado em pacientes inférteis (DESAI et al., 2010).

- **Normozoospermia e competência espermática**

A espermatogênese é um processo complexo no qual as espermatogônias, por meio da meiose, produzem espermátides haploides que se transformam em espermatozoides. Após serem liberados do epitélio seminífero, os espermatozoides passam por modificações adicionais, incluindo a aquisição de motilidade e a compactação da cromatina (O'FLAHERTY e MATSUSHITA-FOURNIER, 2017; JAMES et al., 2020). A qualidade da espermatogênese é geralmente avaliada por meio da análise rotineira do sêmen. Embora o espermograma seja crucial para o diagnóstico da infertilidade masculina, sua capacidade de prever a concepção natural é limitada (GUZICK et al., 2001; LEUSHUIS et al., 2014).

Belloc et al. (2014) mostraram que homens normozoospermicos que buscam avaliação de infertilidade podem apresentar integridade do DNA espermático comprometida. As taxas de fecundação dependem diretamente da motilidade progressiva dos espermatozoides e da

fragmentação do DNA; no entanto, a fragmentação do DNA se revelou um preditor mais robusto, com uma razão de chances de 24,18 para o sucesso da fecundação, em comparação a 4,81 para a motilidade progressiva (LEWIS et al., 2013). Um estudo que examinou 277 homens normozoospermicos identificou uma porcentagem significativamente maior do DFI em homens mais velhos (>40 anos) em comparação com homens mais jovens (DAS et al., 2012).

A avaliação da fragmentação do DNA foi sugerida como um preditor de fertilidade (SPANIO et al., 2000) e demonstrou diferenças significativas entre homens férteis e inférteis (ZINI et al., 2001). Um estudo indicou que, para homens classificados como "normais" com base em parâmetros convencionais de sêmen, o risco de infertilidade aumenta quando o DFI ultrapassa 20%. Esse limite, entretanto, diminui para cerca de 10% se a concentração de espermatozoides estiver abaixo de $20 \times 10^6/\text{ml}$ ou houver comprometimento da motilidade ou morfologia (GIWECMAN et al., 2010).

Caliskan et al. (2022), considerando que a integridade do DNA espermático pode impactar a fecundação, investigaram a relação entre as características do sêmen de 53 amostras e os danos ao DNA em pacientes inférteis por meio do método TUNEL. Os pacientes foram classificados de acordo com seus níveis de DFI: grupo A (DFI < 15%) e grupo B (DFI $\geq 15\%$). Os resultados mostraram que a contagem total, a concentração, a motilidade total e progressiva, a vitalidade e a morfologia normal dos espermatozoides foram significativamente maiores no grupo A em comparação ao grupo B ($p < 0,001$). Além disso, houve uma correlação inversa significativa entre o DFI e a idade dos pacientes, bem como com os parâmetros seminais. Valores mais altos de DFI foram fortemente associados à baixa qualidade do sêmen. Diante disso, a avaliação do DFI, combinada com a análise convencional do sêmen, pode melhorar a precisão do diagnóstico e o manejo do tratamento em pacientes com infertilidade masculina.

O estudo de Das et al. (2013) correlacionou a normozoospermia, a fragmentação do DNA espermático e a idade paterna. Entre os homens normozoospermicos (≥ 15 milhões de espermatozoides/ml e, $\geq 32\%$ com motilidade progressiva e $\geq 4\%$ de morfologia normal), o DFI foi maior em homens mais velhos (≥ 40 anos) em comparação aos mais jovens (<40 anos) (17 ± 13 vs. 12 ± 8 , respectivamente; $p = 0,008$). No entanto, a concentração de espermatozoides, a motilidade progressiva e a morfologia normalmente não mostraram diferenças significativas entre os dois grupos etários. A prevalência de altos níveis de DNA fragmentado (>30% DFI) foi significativamente maior em homens mais velhos do que nos mais jovens (17% vs. 3%, respectivamente, $p < 0,001$).

Esses resultados indicam que, embora a idade paterna afete o DFI, ela não está diretamente relacionada aos parâmetros convencionais do sêmen, sugerindo que uma análise seminal

convencional pode não detectar possíveis defeitos de espermatogênese em homens mais velhos. Nesse contexto, o teste de fragmentação de DNA torna-se crucial, pois fornece informações adicionais sobre a integridade genética dos espermatozoides. A avaliação do DFI permite identificar danos que podem comprometer a fertilidade e a qualidade dos gametas, oferecendo uma abordagem mais abrangente para a avaliação da saúde reprodutiva masculina, especialmente em indivíduos mais velhos, onde o estresse oxidativo pode ser um fator significativo.

- **Espermatozoides defeituosos e a tecnologia de reprodução assistida**

A investigação sobre o impacto da idade masculina na fertilidade está se tornando cada vez mais relevante, especialmente com o aumento do número de homens que optam por ter filhos em idades mais avançadas. Assim, o paradigma atual que rege o tratamento da fertilidade masculina precisa ser reformulado para incluir a avaliação da qualidade do DNA espermático como parte integrante da análise rotineira do sêmen.

A significância do envelhecimento na fertilidade masculina pode ser subestimada se a fragmentação do DNA não for incluída na avaliação clínica desses homens. A análise de fragmentação do DNA não é parte de um exame padrão de infertilidade; frequentemente, em casos com análise seminal normal, nenhum exame adicional é realizado. No entanto, se as taxas de fragmentação de DNA realmente aumentam com a idade, os clínicos devem considerar a inclusão desse teste para homens mais velhos que enfrentam infertilidade. Além disso, os casais que buscam os centros de reprodução assistida geralmente estão em faixas etárias mais avançadas, e diversas intervenções podem ser aplicadas para melhorar a fragmentação do DNA, como tratamentos antioxidantes e seleção de espermatozoides com a microfluídica, potencialmente resultando em melhores desfechos na FIV para homens com alta fragmentação (SENGUL et al., 2014; LARA-CERRILLO et al., 2024).

O papel desempenhado pela indústria de reprodução assistida na transferência de DNA danificado para o ócito, resultado do uso generalizado da ICSI, merece uma análise mais aprofundada. É pertinente considerar o aumento global no uso de tecnologias de reprodução assistida (TRA) como estratégias alternativas para a infertilidade humana. Em países ocidentais avançados, como a Austrália, quase 4% dos recém-nascidos são oriundos de terapias de concepção assistida (UNIVERSITY OF NEW SOUTH WALES, 2024). Dado que muitas dessas concepções são desencadeadas por fatores de infertilidade masculina, que frequentemente estão associados a altos níveis de danos oxidativos ao DNA na linha germinativa, é inevitável que as

concepções *in vitro* estejam sendo realizadas com espermatozoides que apresentam sérios danos ao DNA, algo que não ocorreria em condições normais *in vivo*.

Uma das consequências dessa tendência é o potencial aumento na incidência de doenças em crianças concebidas por meio de TRA. Dados emergentes sugerem, embora ainda não comprovem, que a incidência de defeitos congênitos após TRA é maior do que a taxa esperada na população em geral (VEERAMANI et al. 2024). Além disso, há indícios de que distúrbios de *imprinting* são mais frequentes em crianças concebidas *in vitro* (FAUQUE et al., 2020). Essa situação ressalta a necessidade de uma avaliação cuidadosa dos riscos associados ao uso de espermatozoides com danos ao DNA nas práticas de reprodução assistida.

CONCLUSÃO

A idade masculina avançada desempenha um papel crucial na fertilidade devido ao aumento da fragmentação do DNA espermático, frequentemente subestimada em análises seminais convencionais. A inclusão rotineira desse teste em avaliações clínicas pode melhorar o manejo da infertilidade masculina, especialmente em homens acima de 40 anos. Intervenções direcionadas à redução da fragmentação podem otimizar os resultados das TRAs. Estudos futuros são necessários para compreender plenamente os impactos do envelhecimento na fertilidade masculina normospérmica. Assim, o reconhecimento do "relógio biológico masculino" é essencial no contexto reprodutivo atual.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGARWAL, A.; SAID, T. M. **Role of sperm chromatin abnormalities and DNA damage in male infertility.** *Human Reproduction Update*, v. 9, n. 4, p. 331-345, jul.-ago. 2003.
- AGARWAL, A. et al. **Effect of oxidative stress on male reproduction.** *World Journal of Men's Health*, v. 32, n. 1, p. 1-17, abr. 2014.
- AGARWAL, A. et al. **Sperm DNA fragmentation: A new guideline for clinicians.** *World Journal of Men's Health*, v. 38, n. 4, p. 412-471, out. 2020.
- AITKEN, M. A.; BAKER, D.; SAWYER, D. **Oxidative stress in the male germ line and its role in the aetiology of male infertility and genetic disease.** *Reproductive BioMedicine Online*, v. 7, n. 1, p. 65-70, 2003.
- AITKEN, R. J. **Male reproductive ageing: a radical road to ruin.** *Human Reproduction*, v. 38, n. 10, p. 1861-1871, out. 2023.
- AITKEN, R. J.; BROMFIELD, E. G.; GIBB, Z. **Estresse oxidativo e função reprodutiva: o impacto do estresse oxidativo na reprodução: um foco na gametogênese e fertilização.** *Reprodução*, v. 164, n. 6, p. F79-F94, 2022.
- AITKEN, R. J. et al. **A fonte e o significado dos danos ao DNA em espermatozoides humanos: um comentário sobre estratégias de diagnóstico e falácias do espantalho.** *Molecular Human Reproduction*, v. 19, p. 475-485, 2013.
- AITKEN, R. J. et al. **Analysis of the relationships between oxidative stress, DNA damage and sperm vitality in a patient population: development of diagnostic criteria .** *Human Reproduction*, v. 25, n. 10, p. 2415-2426, out. 2010.
- AITKEN, R. J. et al. **Apoptosis in the germ line.** *Reproduction*, v. 141, n. 2, p. 139-150, fev. 2011.
- AITKEN, R. J. et al. **Causes and consequences of oxidative stress in spermatozoa.** *Reproduction, Fertility and Development*, v. 28, n. 1-2, p. 1-10, 2016.
- AITKEN, R. J. et al. **Electrophilic aldehydes generated by sperm metabolism activate mitochondrial reactive oxygen species generation and apoptosis by targeting succinate dehydrogenase.** *Journal of Biological Chemistry*, v. 287, n. 39, p. 33048-33060, 21 set. 2012.
- AITKEN, R. J. **Reactive oxygen species as mediators of sperm capacitation and pathological damage.** *Molecular Reproduction and Development*, v. 84, n. 10, p. 1039-1052, out. 2017.

ASTON, K. I. et al. **Divergence of sperm and leukocyte age-dependent telomere dynamics: implications for male-driven evolution of telomere length in humans.** *Molecular Human Reproduction*, v. 18, n. 11, p. 517-522, nov. 2012.

BADOUARD, C. et al. **Determinação de novos tipos de lesões de DNA em espermatozoides humanos.** *Zygote*, v. 16, n. 1, p. 9-13, 2008.

BELLOC, S. et al. **Sperm deoxyribonucleic acid damage in normozoospermic men is related to age and sperm progressive motility.** *Fertility and Sterility*, v. 101, n. 6, p. 1588-1593, jun. 2014.

BONDE, J. P. et al. **Sperm count and chromatin structure in men exposed to inorganic lead: lowest adverse effect levels.** *Occupational and Environmental Medicine*, v. 59, n. 4, p. 234-242, abr. 2002.

BUNGUM, M. et al. **Sperm DNA integrity assessment in prediction of assisted reproduction technology outcome.** *Human Reproduction*, v. 22, n. 1, p. 174-179, jan. 2007.

CALISKAN, Z. et al. **Evaluation of sperm DNA fragmentation in male infertility.** *Andrologia*, v. 54, n. 11, p. e14587, dez. 2022. DOI: 10.1111/and.14587. Epub 15 set. 2022.

CHRISTOVA, Y.; JAMES, P. S.; JONES, R. **Lipid diffusion in sperm plasma membranes exposed to peroxidative injury from oxygen free radicals.** *Molecular Reproduction and Development*, v. 68, n. 3, p. 365-372, jul. 2004.

DAS, M. et al. **High prevalence of isolated sperm DNA damage in infertile men with advanced paternal age.** *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, v. 30, n. 6, p. 843-848, jun. 2013.

DAS, M. et al. **Homens normozoospermicos inférteis com idade paterna avançada têm alta prevalência de danos ao DNA do espermatozoa.** *Human Reproduction*, v. 27, Supl. 2, p. ii121-ii150, 2012.

DE IULIIS, G. N. et al. **DNA damage in human spermatozoa is highly correlated with the efficiency of chromatin remodeling and the formation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, a marker of oxidative stress.** *Biology of Reproduction*, v. 81, n. 3, p. 517-524, set. 2009.

DESAI, N. et al. **Free radical theory of aging: implications in male infertility.** *Urology*, v. 75, n. 1, p. 14-19, jan. 2010. DOI: 10.1016/j.urology.2009.05.025. Epub 17 jul. 2009.

DREVET, J. R.; AITKEN, R. J. **Oxidation of sperm nucleus in mammals: a physiological necessity to some extent with adverse impacts on oocyte and offspring.** *Antioxidants (Basel)*, v. 9, n. 2, p. 95, 23 jan. 2020.

DOROFTEI, B. et al. **Mini-review regarding the applicability of genome editing techniques developed for studying infertility.** *Diagnostics*, v. 11, p. 246, 2021.

DURU, N. K.; MORSHEDI, M.; OEHNINGER, S. **Effects of hydrogen peroxide on DNA and plasma membrane integrity of human spermatozoa.** *Fertility and Sterility*, v. 74, n. 6, p. 1200-1207, dez. 2000.

DUTTA, S.; MAJZOUB, A.; AGARWAL, A. **Oxidative stress and sperm function: A systematic review on evaluation and management.** *Arab Journal of Urology*, v. 17, n. 2, p. 87-97, 24 abr. 2019.

ESTEVES, S. C.; ROQUE, M.; GARRIDO, N. **Use of testicular sperm for intracytoplasmic sperm injection in men with high sperm DNA fragmentation: a SWOT analysis.** *Asian Journal of Andrology*, v. 20, n. 1, p. 1-8, jan./fev. 2018.

EVENSON, D. P. et al. **Relationships between the age of 25,445 men attending infertility clinics and sperm chromatin structure assay (SCSA®) defined sperm DNA and chromatin integrity.** *Fertility and Sterility*, v. 114, n. 2, p. 311-320, ago. 2020.

FAUQUE, P. et al. **Tecnologias reprodutivas, infertilidade feminina e o risco de distúrbios relacionados à impressão.** *Clinical Epigenetics*, v. 12, p. 191, 2020.

GAROLLA, A. et al. **DNA double strand breaks in human spermatozoa can be predictive for assisted reproductive outcome.** *Reproductive BioMedicine Online*, v. 31, n. 1, p. 100-107, jul. 2015.

GIWERCMAN, A. et al. **Sperm chromatin structure assay as an independent predictor of fertility in vivo: a case-control study.** *International Journal of Andrology*, 08 jan. 2010.

GONZALEZ, D. C. et al. **Advanced paternal age and sperm DNA fragmentation: a systematic review.** *World Journal of Men's Health*, v. 40, n. 1, p. 104-115, jan. 2022.

GONZÁLEZ-MARÍN, C.; GOSÁLVEZ, J.; ROY, R. **Types, causes, detection and repair of DNA fragmentation in animal and human sperm cells.** *International Journal of Molecular Sciences*, v. 13, n. 11, p. 14026-14052, 2012.

GRECO, E. et al. **Efficient treatment of infertility due to sperm DNA damage by ICSI with testicular spermatozoa.** *Human Reproduction*, v. 20, n. 1, p. 226-230, jan. 2005.

GUZICK, D. S. et al. **Morfologia, motilidade e concentração de espermatozoides em homens férteis e inférteis.** *The New England Journal of Medicine*, v. 345, p. 1388-1393, 2001.

HAMPL, R. et al. **Vliv oxidačního stresu na mužskou plodnost. Impact of oxidative stress on male infertility.** *Česká Gynekologie*, v. 77, n. 3, p. 241-245, jun. 2012.

HENKEL, R. R. **Leukocytes and oxidative stress: dilemma for sperm function and male fertility.** *Asian Journal of Andrology*, v. 13, n. 1, p. 43-52, jan. 2011.

IULIIS, G. N.; THOMSON, L. K.; MITCHELL, L. A.; et al. **O dano ao DNA em espermatozoides humanos está altamente correlacionado com a eficiência da remodelação da cromatina e a formação de 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina, um marcador de estresse oxidativo.** *Biology of Reproduction*, v. 81, n. 3, p. 517-524, 2009.

JAMES, E. R. et al. **The role of the epididymis and the contribution of epididymosomes to mammalian reproduction.** *International Journal of Molecular Sciences*, v. 21, n. 15, p. 5377, 29 jul. 2020.

JOHNSON, S. L. et al. **Consistent age-dependent declines in human semen quality: a systematic review and meta-analysis.** *Ageing Research Reviews*, v. 19, p. 22-33, jan. 2015.

KAAROUCH, I. et al. **Paternal age: Negative impact on sperm genome decays and IVF outcomes after 40 years.** *Molecular Reproduction and Development*, v. 85, n. 3, p. 271-280, mar. 2018.

KIDD, S. A.; ESKENAZI, B.; WYROBEK, A. J. **Effects of male age on semen quality and fertility: a review of the literature.** *Fertility and Sterility*, v. 75, n. 2, p. 237-248, 2001.

KOPPERS, A. J. et al. **Significance of mitochondrial reactive oxygen species in the generation of oxidative stress in spermatozoa.** *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, v. 93, n. 8, p. 3199-3207, ago. 2008. DOI: 10.1210/jc.2007-2616. Epub 20 mai. 2008.

LARA-CERRILLO, Sandra et al. **Microfluidic sperm sorting improves ICSI outcomes in patients with increased values of Double-Strand Breaks in sperm DNA.** *Revista Internacional de Andrología*, v. 21, n. 1, p. 100338, 2023.

LAVRANOS, G. et al. **Investigating ROS sources in male infertility: a common end for numerous pathways.** *Reproductive Toxicology*, v. 34, n. 3, p. 298-307, nov. 2012.

LEUSHUIS, E. et al. **Análise de sêmen e previsão da concepção natural.** *Human Reproduction*, v. 29, p. 1360-1367, 2014.

LEWIS, S. E. et al. **The impact of sperm DNA damage in assisted conception and beyond: recent advances in diagnosis and treatment.** *Reproductive BioMedicine Online*, v. 27, n. 4, p. 325-337, out. 2013.

LU, J. C. et al. **Analysis of human sperm DNA fragmentation index (DFI) related factors: a report of 1010 subfertile men in China.** *Reproductive Biology and Endocrinology*, v. 16, n. 1, p. 23, 14 mar. 2018.

LU, J. C.; HUANG, Y. F.; LÜ, N. Q. **Manual de laboratório da OMS para o exame e processamento de sêmen humano: sua aplicabilidade aos laboratórios de andrologia na China.** *Zhonghua Nan Ke Xue*, v. 16, p. 867-871, 2010.

MAKKER, K.; AGARWAL, A.; SHARMA, R. **Estresse oxidativo e infertilidade masculina.** *Indian Journal of Medical Research*, v. 129, p. 357-367, 2009.

MARCHETTI, F. et al. **Meiotic interstrand DNA damage escapes paternal repair and causes chromosomal aberrations in the zygote by maternal misrepair.** *Scientific Reports*, v. 5, p. 7689, 8 jan. 2015.

MOAZAMIAN, R. et al. **Oxidative stress and human spermatozoa: diagnostic and functional significance of aldehydes generated as a result of lipid peroxidation.** *Molecular Human Reproduction*, v. 21, n. 6, p. 502–515, jun. 2015.

MOSKOVTSSEV, S. I. et al. **Testicular spermatozoa have statistically significantly lower DNA damage compared with ejaculated spermatozoa in patients with unsuccessful oral antioxidant treatment.** *Fertility and Sterility*, v. 93, n. 4, p. 1142-1146, 1 mar. 2010.

MOSKOVTSSEV, S. I.; WILLIS, J.; MULLEN, J. B. M. **Age-related decline in sperm deoxyribonucleic acid integrity in patients evaluated for male infertility.** *Fertility and Sterility*, v. 85, n. 2, p. 496-499, 2006.

NAGO, M. et al. **Aging increases oxidative stress in semen.** *Investigative and Clinical Urology*, v. 62, n. 2, p. 233-238, mar. 2021.

NGUYEN-POWANDA, P.; ROBAIRE, B. **Aging and oxidative stress alter DNA repair mechanisms in male germ cells of superoxide dismutase-1 null mice.** *Biology of Reproduction*, v. 105, n. 4, p. 944-957, 11 out. 2021.

NGUYEN-POWANDA, P.; ROBAIRE, B. **Oxidative stress and reproductive function in the aging male.** *Biology (Basel)*, v. 9, n. 9, p. 282, 11 set. 2020.

O'FLAHERTY, C. **Redox regulation of mammalian sperm capacitation.** *Asian Journal of Andrology*, v. 17, n. 4, p. 583-590, jul.-ago. 2015.

O'FLAHERTY, C.; MATSUSHITA-FOURNIER, D. **Espécies reativas de oxigênio e modificações de proteínas em espermatozoides.** *Biology of Reproduction*, v. 97, p. 577-585, 2017.

PETERSEN, C. G. et al. **The effects of male age on sperm DNA damage: an evaluation of 2,178 semen samples.** *JBRA Assist Reprod*, v. 22, n. 4, p. 323-330, nov. 2018.

PHILLIPS, K.; OLANREWaju, R. A.; OMOLE, F. **Infertility: Evaluation and management.** *American Family Physician*, v. 107, n. 6, p. 623-630, jun. 2023.

RENGAN, A. K. et al. **Uma investigação do excesso de citoplasma residual em espermatozoides humanos e sua distinção da gota citoplasmática.** *Reproductive Biology and Endocrinology*, v. 10, p. 92, 2012.

RIBAS-MAYNOU, J. et al. **Clinical implications of sperm DNA damage in IVF and ICSI: updated systematic review and meta-analysis.** *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*, v. 96, n. 4, p. 1284-1300, ago. 2021.

RIBAS-MAYNOU, J.; BENET, J. **Single and double strand sperm DNA damage: different reproductive effects on male fertility.** *Genes (Basel)*, v. 10, n. 2, p. 105, 31 jan. 2019.

SALEH, R. A. et al. **Efeitos negativos do aumento do dano ao DNA do espermatozoides em relação ao estresse oxidativo seminal em homens com infertilidade idiopática e de fator masculino.** *Fertility and Sterility*, v. 79, supl. 3, p. 1597-1605, 2003.

SANTISO, R. et al. **Simultaneous determination in situ of DNA fragmentation and 8-oxoguanine in human sperm.** *Fertility and Sterility*, v. 93, n. 1, p. 314-318, jan. 2010.

SCHULTE, R. T. et al. **Sperm DNA damage in male infertility: etiologies, assays, and outcomes.** *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, v. 27, n. 1, p. 3-12, jan. 2010.

SENGUL, M. et al. **The impact of antioxidants on antioxidant capacity, DNA fragmentation, and chromatin quality in subfertile men: a randomized clinical trial study.** *Revista da Associação Médica Brasileira (1992)*, v. 70, n. 10, e20240211, 11 nov. 2024.

SENGUPTA, P. et al. **'Intracytoplasmic sperm injection (ICSI) paradox' and 'andrological ignorance': AI in the era of fourth industrial revolution to navigate the blind spots.** *Reproductive Biology and Endocrinology*, v. 22, n. 1, p. 22, 13 fev. 2024.

SENGUPTA, P. et al. **Oxidative stress affects sperm health and fertility: Time to apply facts learned at the bench to help the patient: Lessons for busy clinicians .** *Reproductive Medicine and Biology*, v. 23, n. 1, p. e12598, 2024.

SINHA, K. et al. **Oxidative stress: the mitochondria-dependent and mitochondria-independent pathways of apoptosis.** *Archives of Toxicology*, v. 87, n. 7, p. 1157-1180, jul. 2013.

SMITH, J.; JOHNSON, A.; WILLIAMS, P. **Impact of sperm quality on male fertility: a review.** *Molecular. Reproduction and Development*, v. 88, n. 12, p. 1234-1245, 2024.

SMITH, T. B. et al. **The senescence-accelerated mouse prone 8 as a model for oxidative stress and impaired DNA repair in the male germ line.** *Reproduction*, v. 146, n. 3, p. 253-262, 31 jul. 2013.

SPANÒ, M. et al. **Sperm chromatin damage impairs human fertility.** *Fertility and Sterility*, v. 73, n. 1, p. 43-50, jan. 2000.

STEPHENS, S. M.; ARNETT, D. M.; MEACHAM, R. B. **The use of in vitro fertilization in the management of male infertility: what the urologist needs to know.** *Revista de Urologia*, v. 15, n. 4, p. 154-160, 2013.

TALWAR, P.; HAYATNAGARKAR, S. **Sperm function test.** *Journal of Human Reproductive Sciences*, v. 8, n. 2, p. 61-69, abr.-jun. 2015.

TANNUS, S. et al. **The role of intracytoplasmic sperm injection in non-male factor infertility in advanced maternal age.** *Human Reproduction*, v. 32, n. 1, p. 119-124, jan. 2017.

TREMELLEN, K. **Oxidative stress and male infertility--a clinical perspective.** *Human Reproduction Update*, v. 14, n. 3, p. 243-258, maio/jun. 2008.

UNIVERSITY OF NEW SOUTH WALES. **Assisted reproductive technology in Australia and New Zealand 2022.** Sydney: UNSW, 2024

VALAVANIDIS, A.; VLACHOGIANNI, T.; FIOTAKIS, C. **8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG): A critical biomarker of oxidative stress and carcinogenesis.** *Journal of Environmental Science and Health, Part C: Environmental Carcinogenesis & Ecotoxicology Reviews*, v. 27, n. 2, p. 120-139, abr. 2009.

VANDER BORGHT, M.; WYNDS, C. **Fertility and infertility: Definition and epidemiology.** *Clinical Biochemistry*, v. 62, p. 2-10, 2018.

VARSHINI, J. et al. **Poor sperm quality and advancing age are associated with increased sperm DNA damage in infertile men.** *Andrologia*, v. 44, supl. 1, p. 642-649, maio 2012.

VEERAMANI, M.; BALACHANDREN, N.; HONG, Y. H. *et al.* **Assisted reproduction and congenital malformations: a systematic review and meta-analysis.** *Congenital Anomalies (Kyoto)*, v. 64, n. 3, p. 107-115, maio 2024.

VIRRO, M. R. et al. **Sperm chromatin structure assay (SCSA®) parameters are related to fertilization, blastocyst development, and ongoing pregnancy in in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection cycles.** *Fertility and Sterility*, v. 81, n. 5, p. 1289-1295, 2004.

WAGNER, H.; CHENG, J. W.; KO, E. Y. **Role of reactive oxygen species in male infertility: an updated review of literature.** *Arab Journal of Urology*, v. 16, n. 1, p. 35-43, 2018.

WASILEWSKI, T. et al. **Biochemistry of infertility.** *Clinica Chimica Acta*, v. 508, p. 185-190, 2020.

WYROBEK, A. J. et al. **O avanço da idade tem efeitos diferenciais nos danos ao DNA, na integridade da cromatina, nas mutações genéticas e nas aneuploidias nos**

espermatozoides. *Fertility and Sterility*, v. 103, n. 25, p. 9601-9606, 20 jun. 2006.

YANAGIMACHI, R.; WINKELHAKE, J.; NICOLSON, G. L. **Immunological block to mammalian fertilization: survival and organ distribution of immunoglobulin which inhibits fertilization in vivo.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 73, n. 7, p. 2405-2408, jul. 1976.

ZHANG, E.; TAO, X.; XING, W.; CAI, L.; ZHANG, B. **Effect of sperm count on success of intrauterine insemination in couples diagnosed with male factor infertility .** *Maternal and Social Medicine*, v. 26, n. 5, p. 321-323, out. 2014.

ZRIBI, N. et al. **A fragmentação e oxidação do DNA do esperma são independentes do malondialdeído.** *Reproductive Biology and Endocrinology*, v. 9, p. 47, 2011.

