

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE:  
GINECOLOGIA E OBSTETRÍCIA

**Impacto da idade masculina avançada em desfechos de  
procedimentos de Reprodução Assistida em uma Clínica de  
Fertilização do Sul do Brasil**

Bibiana Cunegatto

Porto Alegre

2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE:  
GINECOLOGIA E OBSTETRÍCIA

**Impacto da idade masculina avançada em desfechos de  
procedimentos de Reprodução Assistida em uma Clínica de  
Fertilização do Sul do Brasil**

Bibiana Cunegatto

Orientador: Profa. Dra. Mirela Foresti  
Jimenez

Coorientador: Profa. Dra. Maria  
Teresa Vieira Sanseverino

Dissertação/tese apresentada como  
requisito parcial para obtenção do  
título de Mestre no Programa de Pós-  
Graduação em Ciências da Saúde:  
Ginecologia e Obstetrícia, Faculdade  
de Medicina, Universidade Federal do  
Rio Grande do Sul.

Porto Alegre

2019

## CIP - Catalogação na Publicação

Cunegatto, Bibiana

Impacto da idade masculina avançada em desfechos de procedimentos de Reprodução Assistida em uma Clínica de Fertilização do Sul do Brasil / Bibiana Cunegatto.

-- 2019.

69 f.

Orientadora: Mirela Foresti Jimenez.

Coorientadora: Maria Teresa Vieira Sanseverino.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Ginecologia e Obstetrícia, Porto Alegre, BR-RS, 2019.

1. Reprodução Humana. 2. Reprodução Assistida. 3. Idade Masculina. 4. Infertilidade Masculina. 5. Idade Paterna. I. Foresti Jimenez, Mirela, orient. II. Vieira Sanseverino, Maria Teresa, coorient. III. Título.

**SUMÁRIO**

LISTA DE ABREVIATURAS	6
LISTA DE FIGURAS	8
LISTA DE TABELAS	9
RESUMO	10
ABSTRACT	12
1. INTRODUÇÃO	14
2. REVISÃO SISTEMÁTICA DA LITERATURA	17
2.1. Estratégia usada para localizar e selecionar as informações	17
2.2. Mapa Conceitual esquemático	19
2.3. Reprodução Humana	20
2.4. Fertilidade e Infertilidade: Definição e Dados Epidemiológicos	21
2.5. Idade Masculina e Paterna Avançada	22
3. JUSTIFICATIVA	29
4. HIPÓTESES	30
4.1. Hipótese nula	30
4.2. Hipótese alternativa	30
5. OBJETIVOS	31
5.1. Objetivo Geral	31
5.2. Objetivos Específicos	31
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	32
7. ARTIGO	36
8. CONSIDERAÇÕES FINAIS	65
9. PERSPECTIVAS	66

10. ANEXOS	67
10.1. Termo de Compromisso de Utilização de Dados (TCUD).	67
10.2. Carta de Aceite do Comitê de Ética em Pesquisa PUCRS.	68
10.3. Aprovação do projeto na Plataforma Brasil.	71

## LISTA DE ABREVIATURAS

ANCOVA – Análise de covariância. Do inglês, *Logistic Regression or Covariance Analyzes*

ART – Do inglês, *Assisted Reproductive Technology*

ASRM – Do inglês, *American Society of Reproductive Medicine*

BPN – Baixo Peso ao Nascer

CDC – Do inglês, *Center for Disease Control and Prevention*

EUA – Estados Unidos da América

FSH – Do inglês, *Follicle-stimulating Hormone*

ICSI – Do inglês, *Intracytoplasmic Sperm Injection*

IVF – Do inglês, *In Vitro Fertilization* ou Fertilização *in vitro*

LILACS – Literatura Latino-Americana e do Caribe em Ciências da Saúde

NB – Do inglês, *Newborn*

OMS – Organização Mundial da Saúde

PESA – Do inglês, *Percutaneous Epididymal Sperm Aspiration*

PGT – Do inglês, *Preimplantation Genetic Test*

PIG – Pequeno para Idade Gestacional

PMP – Parto Muito Prematuro

PP – Parto prematuro

PubMed – Do inglês, *U.S. National Library of Medicine, U.S. National Institutes of Health*

PUCRS – Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul ou *Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul*

RA – Reprodução Assistida

ROS – Do inglês, *Reactive Oxygen Species*

SBRA – Sociedade Brasileira de Reprodução Assistida

SBRH – Sociedade Brasileira de Reprodução Humana

SciELO – Do inglês, *Scientific Electronic Library Online*

SLH – Hospital São Lucas ou *São Lucas Hospital*

TCUD – Termo de Compromisso de Utilização de Dados

TESA – Do inglês, *Testicular Sperm Aspiration*

UFCSPA – Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre ou  
*Federal University of Health Sciences of Porto Alegre*

UFRGS – Universidade Federal do Rio Grande do Sul ou *Federal University of  
Rio Grande do Sul*

WinPEPI – Do inglês, *Programs for Epidemiologists for Windows*

**LISTA DE FIGURAS**

Figura 1: Representação esquemática do mapa conceitual que permeou este projeto de pesquisa 19

*Lista de figuras do artigo*

Figure 1: Sample selection 55



**LISTA DE TABELAS**

Tabela 1: Revisão sistemática da literatura	18
Tabela 2: Valores de referência para os parâmetros seminais publicados nos consecutivos manuais da Organização Mundial da Saúde (OMS).	25

*Lista de Tabelas do artigo*

Table 1: Statistical description of the sample and indication for Reproductive Technology indications	54
Table 2: Laboratory Data: seminal parameters and embryonic evolution	55
Table 3: Embryo transfer and confirmed pregnancies	57
Table 4: Gestational and Neonatal Outcomes	58

## RESUMO

**Introdução:** É sabido que a idade da mulher impacta nos desfechos reprodutivos. Entretanto, não há consenso sobre qual idade pode ser considerada avançada em homens que desejam a paternidade. Embora haja necessidade de mais estudos com base no avanço da idade paterna, sabe-se que o envelhecimento reprodutivo masculino pode afetar uma série de coeficientes determinantes para o resultado direto dos tratamentos de fertilização *in vitro*. **Objetivo:** Analisar e relacionar os efeitos da idade masculina nos procedimentos de reprodução assistida, bem como sua influência em parâmetros como a taxa de oócitos fertilizados, qualidade do desenvolvimento embrionário, volume seminal, concentração espermática, motilidade dos espermatozoides, taxa de gestação, taxa de nascituros, ocorrência de anormalidades cromossômicas embrionárias e desfechos gestacionais e neonatais, associando estes dados com dados preexistentes na literatura.

**Materiais e Métodos:** Este estudo utilizou uma base de dados pré-formada de uma clínica privada de Reprodução Assistida do sul do Brasil, utilizando dados de 2015 a 2018 já anonimizados, totalizando 4105 ciclos. Para análise foi incluído o primeiro ciclo de aspiração folicular com emprego da Injeção Intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI). Os participantes foram divididos entre dois grupos conforme fator de estudo de idade masculina: idade masculina  $\leq 40$  anos (Grupo 1) e idade masculina  $\geq 41$  anos (Grupo 2). Para análise estatística foi utilizado teste de Mann-Whitney, T de Student e Qui-Quadrado com análises residuais ajustadas. Ajustes para variáveis de interesse foram efetuados utilizando regressão logística e ANCOVA. Para todas as análises, o índice de significância foi fixado em 5%. **Resultados:** Foram incluídos 2125

ciclos neste estudo. Foi observada a diminuição de volume seminal e motilidade espermática conforme aumento da idade do homem ( $p=0,001$  para ambos os parâmetros), sem que haja alteração na concentração seminal ( $p>0,05$ ). Além disso, foi encontrado um maior número de transferências embrionárias no terceiro dia de desenvolvimento no grupo 2, bem como maior número de embriões no quinto dia sendo transferidos no grupo 1 ( $p\leq 0,001$  para ambos). O Apgar no primeiro e quinto minuto também se mostraram menores no grupo 2, para gestações únicas e gemelares, mesmo após o ajuste para idade feminina ( $p<0,05$ ). **Conclusão:** A idade masculina parece ter influência sob parâmetros de volume seminal e motilidade espermática. Nossos achados sugerem que a idade feminina tem maior impacto nestes procedimentos. Mais estudos são necessários para entender o correto efeito da idade masculina na prole a médio e longo prazo.

**Palavras-chave:** idade paterna, infertilidade masculina, desfechos de reprodução assistida

## ABSTRACT

**Introduction:** It is well known that women's age impacts reproductive outcomes. However, there is no consensus on which age can be considered advanced in men who aspire paternity. Although there is a need for further studies based on advanced paternal age, it is known that male reproductive aging can affect several determinants that directly impact the results of *in vitro* fertilization treatments. **Objective:** To analyze and identify the effects of male age on assisted reproduction procedures, as well as their influence on parameters such as the rate of fertilized eggs, quality of embryonic evolution, seminal volume, sperm concentration, sperm motility, pregnancy rate, birth rate, occurrence of embryonic chromosomal abnormalities and gestational and neonatal outcomes, associating these data with pre-existing data in the literature. **Materials and Methods:** This study used a database of a private assisted reproduction clinic in southern Brazil, using data from 2012 to 2018 already anonymized, totaling 4105 cycles. For analysis, the first cycle of follicular aspiration with the use of Intracytoplasmic Sperm Injection (ICSI) was included. Participants were divided into two groups according to the male age:  $\leq 40$  years (Group 1) and  $\geq 41$  years (Group 2). Statistical analysis was performed using the Mann-Whitney test, Student's T and Chi-square with adjusted residual analysis. Adjustments for variables of interest were made using logistic regression and ANCOVA. For all analyses the significance index was set at 5%. **Results:** A total of 2125 cycles were included in this study. A decrease in seminal volume and sperm motility was observed as the man's age increased ( $p=0.001$  for both parameters), with no change in seminal concentration ( $p>0.05$ ). In addition, a larger number of embryonic transfers were found on the third day of development in group 2, as

well as a larger number of embryos on the fifth day being transferred in group 1 ( $p \leq 0.001$  for both). Apgar scores in the first and fifth minutes are also lower in group 2 for single and twin pregnancies, even after adjusting for female age ( $p < 0.05$ ). **Conclusion:** Male age appears to have an influence on seminal volume and sperm motility parameters. Our findings suggest that female age has a greater impact on these procedures. Further studies are needed to understand the correct effect of male age on offspring in the medium and long term.

**Keywords:** paternal age, male infertility, assisted reproductive outcomes.

## 1. INTRODUÇÃO

Num contexto em que se adia a geração de prole devido a fatores sociológicos e culturais, é crescente o número de pesquisas que visam entender o impacto que a idade masculina avançada pode gerar sobre a reprodução. Este dado, assim como o já bem estabelecido fator de idade feminina, pode ser um importante influenciador de resultados no âmbito da concepção (HARRIS et al., 2017). Na esfera da reprodução assistida (RA), isso não é diferente. Técnicas como a Injeção Intracitoplasmática de Espermatozoides (ICSI, do inglês *Intracytoplasmic Sperm Injection*), por exemplo, mesmo que possam selecionar espermatozoides morfolologicamente viáveis e obter melhores taxas de fertilização e gravidez, não estão livres de desfechos desfavoráveis. (MILLER et al., 2018). Acredita-se que fatores como a qualidade seminal, decréscimo de função e atividade sexual, queda das concentrações hormonais, alterações genéticas, cromossômicas e epigenéticas, nutrição e estilo de vida, encurtamento dos telômeros, estresse oxidativo e até mesmo doenças imunológicas e inflamatórias, podem ser mais observados conforme aumento gradual da idade dos pacientes (ANAWALT e PAGE, 2017). No entanto, não há consenso definido sobre qual idade pode ser considerada avançada para indivíduos que desejam a paternidade. Sugere-se adotar, no âmbito masculino, a idade de 40 anos como limite, visto que após esse período podem existir modificações em uma série de fatores qualitativos que apontam para a diminuição da fertilidade e o aumento de eventos adversos na filiação (BRAY et al., 2006; RAMASAMY et al., 2015; TORIELLO et al., 2008).

É interessante mencionar que os fatores supracitados são dependentes entre si, tais quais o decréscimo da qualidade seminal, da função sexual e da libido, que atuam por via direta na diminuição dos níveis de testosterona e demais alterações hormonais.

O envelhecimento reprodutivo masculino pode ainda levar a desfechos obstétricos desfavoráveis, incluindo a sua influência negativa nas taxas de implantação, no aumento de chances de aborto espontâneo (SLAMA et al., 2005), na restrição de crescimento fetal e na prematuridade (ALIO et al., 2012). Características que persistem após o período neonatal, como possíveis alterações no desenvolvimento do sistema nervoso - podendo levar a esquizofrenia (SHARMA et al., 2012), o transtorno do espectro autista (REICHENBERG et al., 2006), a doença bipolar (FRANS e LA, 2008), além de maiores chances de neoplasias (RAMASAMY et al., 2015) e maior mortalidade infantil, também podem vir a ser encontradas neste grupo de pacientes com idade avançada (URHOJ et al., 2014). Contudo, é importante notar que não há consenso entre estes e outros estudos de mesmo teor e que, mesmo aqueles que possuem maior significância, apontam para um aumento pequeno do risco.

Em suma, pode-se constatar que o fator da idade masculina apresenta importante papel no que diz respeito à fertilidade e, por consequência, pode representar um significativo fator em tratamentos de RA, bem como, nas chances de gravidez e no desenvolvimento embrionário.

Assim, este estudo utilizou uma base de dados pré-formada para analisar e relacionar os efeitos da idade masculina no sucesso dos procedimentos de RA, bem como sua influência em parâmetros como a taxa de oócitos fertilizados por ciclo, qualidade de desenvolvimento embrionário evolução embrionária, volume

seminal, concentração espermática, motilidade dos espermatozoides, taxa de gestação, taxa de nascituros, ocorrência de anormalidades cromossômicas embrionárias e desfechos gestacionais e neonatais, associando estes dados com dados preexistentes na literatura.



## 2. REVISÃO SISTEMÁTICA DA LITERATURA

### 2.1. Estratégia usada para localizar e selecionar as informações

A revisão sistemática da literatura foi realizada a partir das bases de dados on-line PubMed (*U.S. National Library of Medicine, U.S. National Institutes of Health*), LILACS (*Literatura Latino-Americana e do Caribe em Ciências da Saúde*) e SciELO (*Scientific Electronic Library Online*). Foram adicionados os filtros de seleção de língua de publicação, selecionando-se os idiomas “inglês”, “português” e “espanhol”, e de ano de publicação, desde 2014 até o presente momento.

A revisão foi ampliada por meio da busca a referências bibliográficas de revisões sistemáticas anteriores e de estudos relevantes, solicitação de estudos publicados ou não a especialistas. O total de artigos resultantes da busca, conforme as palavras-chave utilizadas, para cada base de dados pode ser observado na Tabela 1.

Os estudos foram selecionados em um processo de três etapas: em primeiro lugar, os títulos e resumos de pesquisas eletrônicas foram analisados e foram obtidos os artigos completos de todas as citações que eram suscetíveis de satisfazer os seguintes critérios de seleção: serem artigos de pesquisa originais, ensaios clínicos randomizados, revisões, revisões sistemáticas e/ou metanálises. Da mesma forma, conforme leitura, as referências bibliográficas contidas nos artigos pré-selecionados também serviram como base para este trabalho (*backward citation tracking*), bem como artigos que citam os artigos incluídos – via *WoS/Scopus*. Posteriormente, a inclusão ou exclusão dos artigos foram realizadas após leitura dos mesmos.

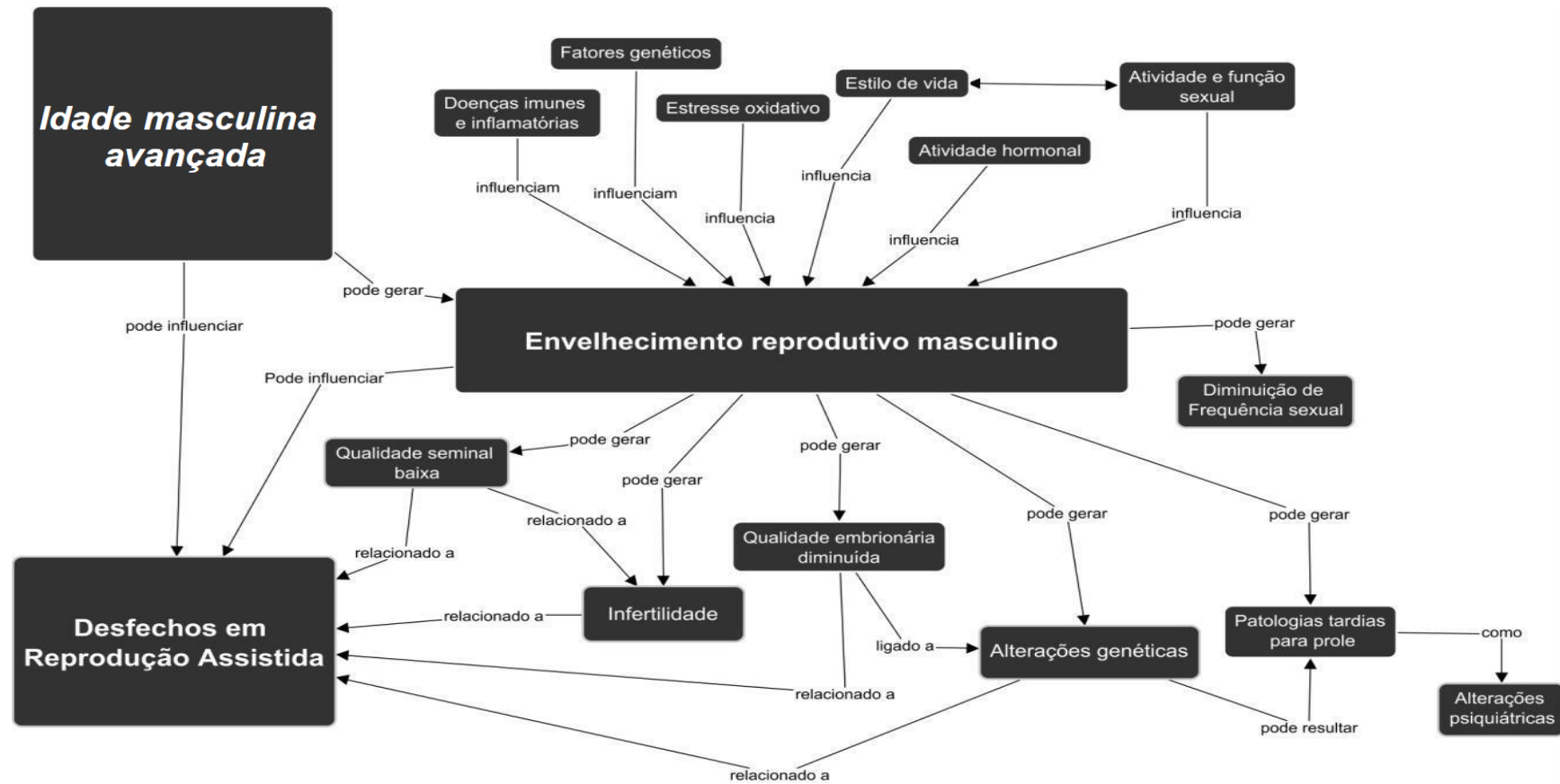
**Tabela 1:** Revisão sistemática da literatura.

	Query	Encontrados	Relevantes
<b>PubMed</b>	(Paternal Age[mh] OR Paternal Age[tw] OR male age[tw]) AND (Infertility, Male[mh] OR Male Infertility[tw] OR Male Sterility[tw] OR Male Subfertility[tw] OR Male Sub-Fertility[tw]) AND (Reproductive Techniques, Assisted[mh] OR Assisted Reproductive Technic*[tw] OR Assisted Reproductive Technique*[tw] OR Assisted Reproductive Technolog*[tw])	32	26
<b>LILACs</b>	("Paternal Age" OR "Edad Paterna" OR "idade paterna" OR "male age" OR "idade masculina") AND ("Infertility, Male" OR "Infertilidad Masculina" OR "Infertilidade Masculina" OR "Male Sterility" OR "Esterilidade Masculina" OR "Male Subfertility" OR "Male Sub-Fertility") AND ("Reproductive Techniques, Assisted" OR Assisted Reproductive Technic* OR Assisted Reproductive Technique* OR Assisted Reproductive Technolog* OR "Técnicas Reproductivas Asistidas" OR "Técnicas de Reprodução Assistida" OR "Tecnologia Reprodutiva Assistida" OR "Técnicas Assistidas de Reprodução" OR "Técnicas Reproductivas Assistidas" OR "Técnicas de Reprodução Assistidas")	2*	2
<b>SciELO</b>	("Paternal Age" OR "Edad Paterna" OR "idade paterna" OR "male age" OR "idade masculina") AND ("Infertility, Male" OR "Infertilidad Masculina" OR "Infertilidade Masculina" OR "Male Sterility" OR "Esterilidade Masculina" OR "Male Subfertility" OR "Male Sub-Fertility") AND ("Reproductive Techniques, Assisted" OR Assisted Reproductive Technic* OR Assisted Reproductive Technique* OR Assisted Reproductive Technolog* OR "Técnicas Reproductivas Asistidas" OR "Técnicas de Reprodução Assistida" OR "Tecnologia Reprodutiva Assistida" OR "Técnicas Assistidas de Reprodução" OR "Técnicas Reproductivas Assistidas" OR "Técnicas de Reprodução Assistidas")	0*	0

Legenda: \*Nestes casos, o filtro para ano de publicação não foi aplicado.

## 2.2. Mapa Conceitual esquemático

Figura 1: Representação esquemática do mapa conceitual que permeia este projeto de pesquisa.



Fonte: Cunegatto (2019).

### 2.3. Reprodução Humana

A reprodução humana é dependente de diversos fatores fisiológicos de alta complexidade, sendo necessárias condições específicas para o seu sucesso. Tais fatores podem ser resumidos em uma produção espermática em número e qualidade necessária, que haja a integridade anatômica e funcional dos sistemas reprodutores feminino e masculino, que a copulação ocorra no momento periovulatório, que haja espermomigração adequada no aparelho feminino, que os ovários mantenham função fisiológica, com atividade hormonal dentro de um limiar correto e originando oócitos maduros e aptos para fertilização, que ocorra a formação de um zigoto sem nenhuma intercorrência e, por fim, que o útero ofereça todo o aporte necessário para boa implantação e interação ovo-materna, permitindo desenvolvimento e nutrição para o conceito. Dessa forma, é possível uma melhor compreensão do porquê de a chance de fecundabilidade de um casal considerado fértil não ultrapassar 20% a cada mês (GONÇALVES et al., 2017), o que acaba tornando a infertilidade uma questão de grande importância para os profissionais especializados nesta esfera.

Além disso, os fatores sociológicos também têm forte impacto na escolha de um indivíduo ou casal na hora de decidir por um aumento familiar e a consequente concepção de uma nova vida. Nos últimos anos, a idade média dos casais na concepção tem aumentado consideravelmente nos países ocidentais. Nos Estados Unidos (EUA) a idade paterna média aumentou 3,5 anos nas últimas décadas (de 27,4 para 30,9 anos). O número de nascidos vivos com pais com 40 anos de idade ou mais aumentou de 4,1% para 8,9%, e para aqueles

cuja idade é de 50 anos ou mais, aumentou de 0,5% para 0,9% entre os anos de 1972 e 2015 (KHANDWALA et al., 2017)

Embora as razões para esse aumento sejam, provavelmente, multifatoriais, elementos como mudanças no nível de escolaridade dos pais, metas de carreira, aceitação e uso de métodos contraceptivos, expectativa de vida e considerações financeiras estão possivelmente envolvidos. É importante notar também que, hoje em dia, com a possibilidade do uso das tecnologias de RA, o processo reprodutivo foi facilitado para estes casais/indivíduos que porventura optam pelo aumento familiar tardiamente ou apresentam alguma complicação em seu andamento (MAZUR e LIPSCHULTZ, 2018).

#### **2.4. Fertilidade e Infertilidade: Definição e Dados Epidemiológicos**

Infertilidade é a falha na obtenção de gestação após 12 meses de relações sexuais desprotegidas, afetando de 10%-15% dos casais em idade reprodutiva (CDC, 2018). Suas causas são geralmente divididas entre o fator masculino - 35% dos casos, aproximadamente, fator tuboperitoneal/endometriose (35%), fator ovariano (15%), infertilidade sem causa aparente (10%) e outros fatores (5%) (SPEROFF e FRITZ, 2005).

A prevalência de infertilidade entre as mulheres é estimada em 5,5% em pacientes com até 30 anos e 20% em mulheres com idade superior a 35 anos. Após os 40 anos, é sabido que a reserva e a qualidade oocitária, além da vascularização uterina, decrescem significativamente e, além disso, há um maior risco de abortamento, culminando numa maior dificuldade reprodutiva (GONÇALVES et al., 2017).

Os mesmos dados para a avaliação do fator masculino, no entanto, são conflitantes em diversos estudos em todo o mundo. De acordo com a Sociedade Americana de Medicina Reprodutiva (ASRM, do inglês, *American Society of Reproductive Medicine*) estima-se que o fator masculino seja contribuinte para a não concepção de prole em aproximadamente 35-40% dos casais inférteis (ASRM, 2012) e, em 8% destes casais, que este seja o único contribuinte para uma não concepção (CDC, 2018).

Nos EUA, aproximadamente 6,1 milhões de casais - cerca de 10% da população em idade reprodutiva apresenta problemas relacionados à fertilidade e 9% dos homens com idades entre 25 e 44 anos relataram consulta a um médico para aconselhamento, teste ou tratamento para infertilidade durante a vida (CDC, 2018). No Brasil, não existem dados precisos para quantificação de infertilidade na população, apesar de a Sociedade Brasileira de Reprodução Assistida (SBRA) informar que cerca de 8 milhões de indivíduos sofram deste problema no nosso país.

Até pouco tempo, poucas publicações sobre a queda da fertilidade masculina com o gradual aumento etário eram robustas e conclusivas, sendo este tema geralmente ligado ao fator feminino (CAMBIAGHI, 2016).

## **2.5. Idade Masculina e Paterna Avançada**

Como mencionado anteriormente, os efeitos da idade materna e sua ação sobre os resultados na reprodução, bem como na saúde da própria mãe e do feto são bem conhecidos. Por outro lado, o mesmo coeficiente não é tão explanado para os homens.

Um dos problemas ao avaliar o impacto reprodutivo da idade masculina é a não existência de um consenso sobre qual a faixa etária “justa” a ser estudada como avançada. Neste sentido, existem trabalhos que consideram a idade de 40 anos como limite aceitável, visto que após esse período já se encontram relatos de modificações em uma série de fatores qualitativos que apontam para a diminuição da fertilidade e o aumento de eventos adversos na filiação (RAMASAMY et al., 2015; TORIELLO et al., 2008). Além disso, é importante notar que a maioria dos estudos que abordam essa questão são confundidos pelas variáveis da companheira, como a idade da mesma, e pela tendência de diminuição da frequência coital com a idade. No entanto, há evidências razoáveis para sugerir que o papel do avanço da idade masculina parece ser um fator de risco baixo, mas não insignificante, para questões reprodutivas (MCPHERSON et al., 2017).

Como exemplo, em um grande estudo de base populacional conduzido no Reino Unido, utilizou-se um levantamento de 8559 gestações para determinar o efeito da idade paterna na gravidez. Após o ajuste para a idade feminina, a concepção em um período de 12 meses teve um declínio de probabilidade de 30% para homens com mais de 40 anos, em comparação com homens com menos de 30 anos de idade (FORD et al., 2000).

Em procedimentos de RA, a idade masculina deve ser considerada como importante variável na avaliação de desfechos das técnicas empregadas, ainda que haja processamento do material seminal ou de aspiração de epidídimo ou testicular com consequente seleção de gametas masculinos potencialmente aptos para o sucesso da fertilização. Fatores como a qualidade seminal, decréscimo de função e atividade sexual, queda das concentrações hormonais,

alterações genéticas, cromossômicas e epigenéticas, nutrição e estilo de vida, encurtamento dos telômeros, estresse oxidativo e até mesmo doenças imunológicas e inflamatórias são observados conforme aumento gradual da idade dos pacientes (ANAWALT e PAGE, 2017).

As diferenças na reprodução que essas mudanças na fertilidade podem causar variam desde redução de taxas de implantação, aumento de chances de aborto espontâneo (SLAMA et al., 2005), restrição de crescimento fetal e prematuridade (ALIO et al., 2012) até características que persistem após o período neonatal, como possíveis alterações no desenvolvimento do sistema nervoso, acarretando em maiores chances de esquizofrenia (SHARMA et al., 2012), distúrbios do espectro autista (REICHENBERG et al., 2006), distúrbio bipolar (FRANS e LA, 2008), além de maiores chances de neoplasias (RAMASAMY et al., 2015) e maior mortalidade infantil (URHOJ et al., 2014).

### *2.5.1 Alterações ligadas a idade masculina e paterna avançada*

Existem várias abordagens quando se avalia possíveis itens qualitativos que podem sofrer alteração conforme aumento da idade de um indivíduo. É importante notar que os homens têm um padrão de qualidade seminal considerado fisiológico e que qualquer alteração nestes componentes pode significar uma perda considerável de fertilidade (DZIK et al. 2010). A Tabela 2 descreve a variação dos valores de referência para os parâmetros seminais publicados nos consecutivos manuais da Organização Mundial da Saúde (OMS).



**Tabela 2:** Valores de referência para os parâmetros seminais publicados nos consecutivos manuais da Organização Mundial da Saúde (OMS).

Parâmetros seminais	Edição (Ano de publicação)				
	1ª (1980)	2ª (1987)	3ª (1992)	4ª (1999)	5ª (2010) <sup>1</sup>
Volume (mL)	--	≥2,0	≥2,0	≥2,0	≥1,5
Concentração (x10 <sup>6</sup> por mL)	20-200	≥20	≥20	≥20	15
Concentração total (x10 <sup>6</sup> )	--	≥240	≥40	≥40	39
Motilidade total (%)	≥60	≥50	≥50	≥50	40
Motilidade progressiva <sup>2</sup>	≥2 <sup>3</sup>	≥25%	≥25% (grau a)	≥25% (grau a)	32% (a=b)
Vitalidade (%vivos)	--	≥50	≥75	≥75	58
Morfologia (%normais)	80,5	≥50	≥30 <sup>4</sup>	≥14 <sup>5</sup>	4 <sup>6</sup>
Leucócitos (x10 <sup>6</sup> por mL)	<4,7	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0

Legenda: <sup>1</sup>Valores de referência correspondentes ao percentil 5, obtidos pela distribuição dos dados dos espermogramas de homens que engravidaram suas esposas num intervalo ≤12 meses; <sup>2</sup>grau a=motilidade progressiva rápida (>25µm por s); grau b=motilidade progressiva lenta (5 a 25 µm por s); <sup>3</sup>progressão para frente (escala 0 a 3); <sup>4</sup>Valor arbitrário; <sup>5</sup>valor não definido, porém sugerido levando-se em consideração o critério estrito; <sup>6</sup>critério estrito de Tygerberg. (Adaptado de Esteves et al., 2012).

Uma das alterações seminais já descritas em associação ao avanço da idade masculina é a diminuição da qualidade seminal. Nos estudos de Auger (1995) e Fisch (1996) foram evidenciados a redução da concentração de espermatozoides conforme aumento da idade, sem que haja alteração no volume seminal, bem como a diminuição de espermatozoides móveis e de morfologia normal.

Outrossim, o estilo de vida e doenças acarretadas durante sua existência podem ter impacto numa possível concepção futura. Tabagismo, obesidade e doenças associadas (por exemplo, diabetes e hipertensão) também

podem influenciar parâmetros fisiológicos de fertilidade (DZIK et al., 2010). Além disso, a frequência e qualidade sexual também podem vir a ser alteradas conforme envelhecimento e são variáveis que afetam o tempo de concepção e até mesmo as taxas de gravidez (WEISNSTEIN e STARK, 1994; ROSEN et al., 2005). No entanto, a própria disfunção sexual e seu impacto na infertilidade podem ser superados pelas tecnologias de RA.

Alterações testiculares foram descritas à medida que a idade masculina aumenta, visto que as células de Leydig e a produção de testosterona se mostram diminuídas em uma população masculina com idade avançada, se comparadas a homens mais jovens (PANIAGUA et al., 1991). Neste contexto, há declínio na produção de espermatozoides e associação com alterações genéticas importantes como na integridade do DNA espermático (SINGH et al., 2003), mutações pontuais (GLASER et al., 2003), diminuição do comprimento telomérico (BROER et al., 2013), aumento das taxas de mutação *de novo* (CROW, 2000), estrutura cromossômica, apoptose e fatores epigenéticos (CURLEY et al., 2011).

Aberrações cromossômicas, diferente das aneuploidias, também parecem ser mais comuns em homens com idade entre 45 e 59 anos. No entanto, esta característica não é usada como uma indicação específica para a triagem genética pré-implantacional quando o motivo é a idade masculina avançada. Além disso, embora exista uma correlação entre a idade paterna e mutações *de novo*, o diagnóstico genético pré-implantacional, nestes casos, é útil apenas para alvos genéticos previamente conhecidos e, portanto, não é realizado apenas para redução de risco para homens de idade avançada (HARRIS et al., 2017).

Ainda, há evidências de que a idade paterna avançada está associada a um aumento de mutações autossômicas dominantes novas. No entanto, o risco de uma doença específica é pequeno devido à raridade dos distúrbios hereditários autossômicos dominantes (HARRIS et al., 2017).

O fator idade parece estar associado a um pequeno aumento no risco de aborto espontâneo e menores taxas de implantação embrionárias, ainda que esse risco seja muito menor do que o observado com a idade feminina (HARRIS et al., 2017).

Os riscos de outros desfechos adversos na prole são pouco descritos na literatura. Evidências recentes apontam para uma associação entre idade materna e paterna a paralisia cerebral, transtornos neurocognitivos e transtornos psiquiátricos (BALASCH e GRATACOS, 2012).

O estudo de Alio *et al.* (2012) utilizou os dados ligados à maternidade no Missouri, entre os anos de 1989 e 2005, para avaliar se a idade paterna afeta alguns desfechos perinatais: baixo peso ao nascer (BPN), parto prematuro (PP), natimorto e tamanho pequeno para a idade gestacional (PIG). Esses desfechos foram analisados através de faixas diferentes de idade paterna (<20, 20-24, 25-29, 30-34, 35-39, 40-45 e > 45 anos). Crianças nascidas de pais com idade entre 40 e 45 anos apresentaram um risco 24% maior de natimorto, mas um risco reduzido de PIG. Um risco 48% maior de morte fetal tardia foi observado em recém-nascidos do grupo com idade paterna avançada (>45 anos). Além disso, este mesmo grupo apresentou um risco 19%, 13% e 29% maior para BPN, PP e parto muito prematuro (PMP), respectivamente. Crianças nascidas de pais com idade entre 30 e 39 anos tiveram um menor risco de BPN, PP e PIG, ao passo que aqueles nascidos de pais com 24 anos ou mais jovens tinham uma

probabilidade elevada de ter esses mesmos resultados. Esses resultados demonstram que a idade paterna parece influenciar os desfechos do parto. O mesmo estudo afirma, ainda que não houve evidências de aumento significativo de anormalidades cromossômicas em crianças de pais mais velhos, incluindo aneuploidia e defeitos estruturais, com 2 exceções: Síndrome de Klinefelter e Trissomia do 21. Ainda, evidenciou risco maior para complicações como acondroplasia, Síndrome de Apert, Síndrome de Pfeiffer, Síndrome de Crouzon, neurofibromatose I, retinoblastoma, fístula traqueoesofágica e autismo.

É importante lembrar, no entanto, que a maioria das conclusões descritas anteriormente são derivadas de estudos pouco robustos, não tendo uniformidade quanto à população estudada e nem reprodutibilidade garantida. Portanto, estes dados devem ser interpretados com cautela.

### 3. JUSTIFICATIVA

Já é bem comprovado o efeito deletério da idade feminina avançada no resultado de tratamentos de RA. Por outro lado, as evidências sobre o efeito da idade masculina e paterna avançada ainda são inconclusivas, uma vez que há dados apontando tanto a favor da existência deste efeito negativo, quanto contra. Além disso, a maioria dos estudos disponíveis foram realizados em países europeus, norte-americanos e asiáticos. Dessa forma, são necessários dados práticos e válidos no Brasil, fazendo-se imprescindível que haja suprimento desta falta.

Os resultados deste estudo podem vir a ser úteis para a área de RA, na elaboração de novas técnicas, fornecendo dados para o aconselhamento de casais que desejem o aumento familiar e estejam em idade avançada.

## **4. HIPÓTESES**

### **4.1. Hipótese nula**

O aumento da idade masculina não influencia no sucesso de procedimentos de RA.

### **4.2. Hipótese alternativa**

O aumento da idade masculina diminui a probabilidade de resultado favorável em procedimentos de RA.

## **5. OBJETIVOS**

### **5.1. Objetivo Geral**

Relacionar a idade masculina e/ou paterna com desfechos de procedimentos em RA.

### **5.2. Objetivos Específicos**

Verificar se a idade masculina e/ou paterna avançada têm influência nos seguintes parâmetros:

- Concentração e volume seminal
- Motilidade de espermatozoides
- Taxa de oócitos fertilizados por ciclo.
- Qualidade do desenvolvimento embrionário, conforme taxa de blastocistos gerados.
- Taxa de aneuploidias
- Transferência embrionária
- Gravidez e evolução gestacional
- Idade gestacional ao nascimento
- Dados dos nascituros (gestação única e gemelar), como sexo, peso, comprimento e Apgar no primeiro e quinto minuto.
- Relacionar resultados com àqueles encontrados na literatura.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALIO, A. P.; SALIHU, H. M.; MCINTOSH, C.; *et al.* **The Effect of Paternal Age on Fetal Birth Outcomes.** American Journal of Men's Health, v. 6, n. 5, p. 427–435, 2012.

AMERICAN SOCIETY FOR REPRODUCTIVE MEDICINE. **Infertility: Na Overview.** Disponível em: <<https://www.reproductivefacts.org/news-and-publications/patient-fact-sheets-and-booklets/documents/fact-sheets-and-info-booklets/infertility-an-overview-booklet/>>

ANAWALT, B. D.; PAGE, S. T. **Causes of male infertility.** Mastumoto, A.M., Martin, K.A., ed. UpToDate. 2017. Acesso em 2 de Janeiro de 2019.

AUGER, J.; KUNSTMANN, J. M.; ZYGLICK, F.; *et al.* **Decline in Semen Quality Among Fertile Men in Paris During the PAst 20 Years.** The New England Journal of Medicine. Vol 332. Num 5. 281-285. 1995.

BALASCH, J.; GRATACÓS, E. **Delayed childbearing: effects on fertility and the outcome of pregnancy.** Curr Opin Obstet Gynecol. Jun;24(3):187-93, 2012.

BRAY, I.; GUNNELL, D.; DAVEY, S.G. **Advanced paternal age: how old is too old?** J Epidemiol Community Health; 60(10):851, 2006.

BROER, L.; CODD, V.; NYHOLT, D. R.; *et al.* **Meta-analysis of telomere length in 19,713 subjects reveals high heritability, stronger maternal inheritance and a paternal age effect.** Eur J Hum Genet; 21:1163, 2013.

CAMBIAGHI, A. S. **Manual Prático de Reprodução Assistida: Para o Ginecologista.** Ed. La Vida Press, 2016.

CENTRO DE CONTROLE E PREVENÇÃO DE DOENÇAS (CDC). **Infertility FAQs.** Disponível em: <<https://www.cdc.gov/reproductivehealth/Infertility/>>.

CROW, J. F. **The origins, patterns and implications of human spontaneous mutation.** Nat Rev Genet; 1:40, 2000.

CURLEY, J. P.; MASHOODH, R.; CHAMPAGNE, F. A. **Epigenetics and the origins of paternal effects.** Horm Behav; 59:306, 2011.



DZIK, A.; PEREIRA, D.H.M.; CAVAGNA, M.; *et al.* **Tratado de Reprodução Assistida**. 5ª Edição. São Paulo, 2010.

ESTEVES, S. C.; ZINI, A.; AZIZ, N.; ALVAREZ, J. G.; SABANEH, E. S.; AGARWAL, A. **Critical Appraisal of World Health Organization's New Reference Values for Human Semen Characteristics and Effect on Diagnosis and Treatment of Subfertile Men**. *Urology*, 79(1), 16–22, 2012.

FISCH, H.; GOLUBOFF, E. T.; OLSON, J.H. *et al.* **Semen analyses in 1,283 men from the United States over a 25-year period: no decline in quality**. *Fertility and Sterility*, 65(5), 1009–1014, 1996.

FORD, W. C.; NORTH, K.; *et al.* **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.

FRANS, E. M.; LA, N. **Advancing Paternal Age and Bipolar Disorder**. *Archives of General Psychiatry*, v. 65, n. 9, p. 7, 2008.

GLASER, R. L.; BROMAN, K. W.; SCHULMAN, R. L.; *et al.* **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

GONÇALVES, M. A. G.; *et al.* **Ginecologia: básica e avançada**. Porto Alegre. Ed. Edipucrs, 2017.

HARRIS, I.D. **Effect of advanced paternal age on fertility and pregnancy**. Simpson, L.L, Eckler, K., ed. UpToDate. 2018. Accessed on August 27, 2019.

KHANDWALA, Y. S.; ZHANG, C. A.; EISENBERG, M. L. **The age of fathers in the USA is rising: an analysis of 168867480 births from 1972 to 2015**. *Hum Reprod*; 32(10): 2110–6. 2017.

MAZUR, D. J.; LIPSHULTZ, L. I. **Infertility in the Aging Male**. *CurrUrol Rep*. 19(7):54.

MCPHERSON, N. O.; ZANDER-FOX, D.; VINCENT, A. D.; LANE, M. **Combined advanced parental age has an additive negative effect on live birth rates-data from 4057 first IVF/ICSI cycles**. *J Assist Reprod Genet*. Feb;35(2):279-287. 2018.

MILLER, K. **Intracytoplasmic sperm injection - UpToDate**. Disponível em: <<https://www.uptodate.com/contents/intracytoplasmic-sperm-injection>>.

PANIAGUA, R.; NISTAL, M.; SÁEZ, F. J.; FRAILE, B. Ultrastructure of the aging human testis. *Journal of Electron Microscopy Technique*, 19(2), 241–260, 1991.

RAMASAMY, R.; CHIBA, K., BUTLER, P.; *et al.* **Male biological clock: a critical analysis of advanced paternal age**. *Fertility and Sterility*, v. 103, n. 6, p. 1402–1406, 2015.

REICHENBERG, A.; GROSS, R.; WEISER, M.; *et al.* **Advancing Paternal Age and Autism**. *Archives of General Psychiatry*, v. 63, n. 9, p. 1026, 2006.

ROSEN, R. C.; WING, R.; SCHNEIDER, S.; *et al.* **Epidemiology of erectile dysfunction: the role of medical comorbidities and lifestyle factors**. *Urol Clin North Am*; 32:403. 2005.

SHARMA, R.; AGARWAL, A.; ROHRA, V. K; *et al.* **Effects of increased paternal age on sperm quality, reproductive outcome and associated epigenetic risks to offspring**. *Reproductive Biology and Endocrinology*, v. 13, n. 1, 2015.

SINGH, N. P.; MULLER, C. H.; BERGER, R. E. **Effects of age on DNA double-strand breaks and apoptosis in human sperm**. *Fertil Steril*; 80:1420, 2003.

SLAMA, R.; BOUYER, J.; WINDHAM, G.; *et al.* **Influence of Paternal Age on the Risk of Spontaneous Abortion**. *American journal of epidemiology*, v. 161, n. 9, p. 816–823, 2005.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE REPRODUÇÃO HUMANA (SBRH). **Análise dos registros de dados da América Latina em reprodução assistida (dezembro de 2017)**. Disponível em: <<https://embriologia.sbrh.org.br/?p=1180>>.

SPEROFF, L.; FRITZ, M. **The clinical gynecologic endocrinology and infertility**. 7th Edition, Ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2005.

TORIELLO, H. V.; MECK, J. M. **Statement on guidance for genetic counseling in advanced paternal age**. *Genetics in Medicine*, v. 10, n. 6, p. 457–460, 2008.

URHOJ, S. K.; JESPERSEN, L. N.; NISSEN, M.; *et al.* **Advanced paternal age and mortality of offspring under 5 years of age: a register-based cohort study**. *Human Reproduction*. v. 29, n. 2, p. 343–350, 2014.

WEINSTEIN, M.; STARK, M. **Behavioral and biological determinants of fecundability**. Ann N Y AcadSci; 709:128, 1994.

## 7. ARTIGO

### IMPACTO DA IDADE MASCULINA AVANÇADA EM DESFECHOS DE PROCEDIMENTOS DE REPRODUÇÃO ASSISTIDA.

#### THE IMPACT OF ADVANCED MALE AGE ON ASSISTED REPRODUCTION PROCEDURES OUTCOME

CUNEGATTO B<sup>\*1,2</sup>, HENTSCHE MR<sup>2,3</sup>, TELOKEN C<sup>2,5</sup>, PETRACCO A<sup>2</sup>, BADALOTTI M<sup>2,3</sup>, FERREIRA CF<sup>1</sup>, AZAMBUJA, RM<sup>2</sup>, SANSEVERINO MTV<sup>2,3</sup>, JIMENEZ MF<sup>1,4</sup>.

1. Graduate Program in Health Science: Gynaecology and Obstetrics - School of Medicine, Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS).
2. Fertilitat – Reproductive Medical Center.
3. School of Medicine, Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul (PUCRS).
4. Department of Gynaecology and Obstetrics of the Federal University of Health Sciences of Porto Alegre (UFCSPA)
5. Department of Urology of the Federal University of Health Sciences of Porto Alegre (UFCSPA).

**Full names:** Bibiana Cunegatto, Marta Ribeiro Hentschke, Claudio Telöken, Alvaro Petracco, Mariangela Badalotti, Charles Ferreira, Ricardo Marques de Azambuja, Maria Teresa Vieira Sanseverino, Mirela Foresti Jimenez.

**\*Corresponding author:** Bibiana Cunegatto

Mailing address: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Department of Gynaecology and Obstetrics - Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Rua Ramiro Barcelos, 2350, 90035-903, Porto Alegre, RS, Brazil. Phone/Fax: +55 51 981334265

**E-mail addresses:** bcunegatto@gmail.com, martahentschke@gmail.com, urologyteloken@yahoo.com, petracco@fertilitat.com.br, mariangela@fertilitat.com.br, neurocientista@hotmail.com, msanseverino@hcpa.edu.br, mirela.foresti@gmail.com

## ABSTRACT

**Introduction:** Male reproductive aging may affect several determinants in assisted reproduction techniques (ART) outcomes. The literature usually considers the age of 40 as cutoff. After this period there are changes in qualitative factors that may decrease fertility and increase adverse events in the future generation. **Objectives:** To analyze the effects of paternal age in ART outcomes. **Methods:** A retrospective cross-sectional study, using a reproductive medicine center database was performed from January 2015 to December 2018. Data from 2125 assisted reproductive cycles were evaluated (only the first assisted reproductive procedures were included). The samples were divided into two groups (group 1,  $\leq 40$  years,  $n=1429$  and group 2,  $\geq 41$  years,  $n=696$ ). The Intracytoplasmic Sperm Injection technique (ICSI) was performed in all cases. Mann-Whitney test, Student's t-test, Logistic Regression, ANCOVA and Chi-square test were applied for statistical analysis. The null hypothesis was rejected when  $p < 0.05$ . **Results:** A decrease in seminal volume and sperm motility was observed as the male age increased ( $p = 0.001$  for both parameters), with no changes in seminal concentration ( $p > 0.05$ ). In addition, a higher number of embryos were transferred on the third day of development in group 2, while a higher number of embryos were transferred on the fifth day, in group 1 ( $p \leq 0.001$ ). Apgar index in the first and fifth minutes were also lower in group 2 for single and twin pregnancies, even after adjusting for female age ( $p < 0.05$ ). **Conclusion:** Male age seems to have an influence on seminal volume and sperm motility parameters. However, female age seems to still have a greater impact on ART when compared to male age. Further studies are needed to better understand

the effect of male age on newborns in medium and long term. Also, it seems to be important to advise couples who will be submitted to ART procedures about the possible negative effects associated with male age, or also suggest the pre-implantation biopsy prior to procedure when advanced male age is presented.

**Keywords:** paternal age, male infertility, assisted reproductive outcomes.

## INTRODUCTION

In a context where parenthood is delayed due to social and cultural factors, a growing number of researches aim to understand the impact of male age on reproduction. This factor can have a great influence on the results of conception<sup>1</sup> and on Assisted Reproduction Technology (ART). However, there is no consensus about which age should be considered advanced for individuals who seek fatherhood. There are studies that consider the age of 40 as the acceptable upper limit, seeing possible modifications in several qualitative factors that lead to a reduction of fertility and the increase of adverse events in offsprings after this period<sup>2, 3</sup>.

Although more standardized studies are needed, the male age may affect a series of coefficients that are determinant to ART outcomes. Examples like poor semen quality; reduced sexual functioning and activity; decreased hormone concentrations; increased genetic, chromosomal and epigenetic abnormalities; poor nutrition and lifestyle; telomere shortening; oxidative stress, and even immune and inflammatory diseases are seen more frequently as the patients' age increases<sup>1,4</sup>. Consequently, unfavorable outcomes such as implantation failures, miscarriages<sup>5</sup>, fetal growth restriction and prematurity<sup>6</sup> can be observed. Also, characteristics that persist after the neonatal period, such as abnormalities in the nervous system development, leading to higher risk of schizophrenia<sup>7</sup>, disorders of the autistic spectrum<sup>8</sup>, bipolar disorder<sup>9</sup>, higher risk of neoplasms<sup>2</sup> and higher child mortality<sup>10</sup> were also previously described. However, there is no consensus in the literature about the influence of male age in ART outcomes.

Thus, we hypothesized that as male age increases, the chances of favorable outcomes in ART procedures decreases, including embryo and fetal development.

Therefore, this study aims to analyze the effects of male age in ART outcomes in laboratory and clinical practice parameters.



## RESULTS

### Couple characteristics and Assisted Reproductive Technology indications

A total of 2125 patients met the eligible criteria. The sample characteristics are described in Table 1. A higher number of patients with oligospermia were observed in group 1, while vasectomy was more frequent in group 2 (Chi-square test,  $p = 0.048$  and  $p \leq 0.0001$ , respectively). Regarding the sperm origin, the ejaculate collection was more prevalent in group 1, while percutaneous epididymal sperm aspiration (PESA) was more prevalent in group 2 (Chi-square test,  $p \leq 0.0001$ ). However, it was observed a loss of significance when when the results were adjusted for vasectomy (Chi-square test,  $p > 0.05$ ). Regarding the female age, group 1 presented lower female age ( $p \leq 0.0001$ ), corroborating to the increased female age in group 2 (Chi-Square test,  $p \leq 0.0001$ ). As for ART indications, the presence of endometriosis and ovarian factor were predominantly observed in group 1 (Chi-square test,  $p = 0.009$  and  $p \leq 0.013$ , respectively). For the variables comprising both genders, infertility without an apparent cause was associated with group 1, and preimplantation genetic test (PGT), as an indication for the procedure, was associated with group 2 (Chi-square test,  $p \leq 0.0001$ , for both parameters). There were no statistical differences between the other variables related to ART indications.

### **Laboratory Data: seminal parameters and embryonic evolution**

When analyzing laboratory data (Table 2), the volume (mL) and sperm motility (%) were higher in group 1 (Mann-Whitney Test,  $p = 0.001$ ). Additionally, the blastocyst generation rate (%) was lower in group 2 (Mann-Whitney Test,  $p = 0.035$ ), even though the difference was lost after adjusting for female age. When considering the aneuploidy rates (%), there was no difference between groups after the same adjustment (ANCOVA,  $p = 0.425$  and  $p = 0.385$ , respectively). There were no statistical differences between other laboratory parameters.

### **Embryo Transfer and Confirmed Pregnancies**

As presented in Table 3, embryo transfer was more frequently performed in group 1 (Chi-square test,  $p = 0.018$ ), which was associated with the 5th day of evolution (Chi-square test,  $p \leq 0,0001$ ); while in group 2, embryos in 3th day were seen more frequently (ANCOVA,  $p = 0.026$ ). The frequency of clinical pregnancy was higher in group 1 (Chi-square test,  $p = 0.047$ ), although the significance was lost after adjusting for female age.

### **Gestational and Neonatal Outcomes**

The gestational and neonatal outcomes are shown in Table 4. Data related to twin pregnancies are presented as Newborn 2 (NB2) ( $n = 50$ ). The Apgar score at the 1st minute was higher in group 1, even after adjusting for the female age for single and twin pregnancies (ANCOVA,  $p = 0.021$  and  $p = 0.002$ , respectively).

Additionally, the Apgar score at the 5<sup>th</sup> minute was higher in the same group for twin pregnancies, after adjusting for female age (ANCOVA,  $p = 0.008$ ). There were no statistical differences in gestational age, mode of delivery, gender, birthweight and birth length between groups.

## DISCUSSION

This study evaluated the impact of male age on ART procedures as well as on embryonic and fetal development in 2125 first cycles. Differences that may be important for ART outcomes were found between the two study groups: male age  $\leq 40$  years (Group 1) and male age  $\geq 41$  years (Group 2).

In the total number of participants in our study, the number of indications for oligospermia was higher in Group 1, while the indication for vasectomy occurred more for the age Group 2. Vasectomy in Brazil is performed according to the Brazilian family planning law (n<sup>o</sup> 9.263 / 1996), in individuals with full civil capacity and over the age of 25, or at least with two living children<sup>11</sup>, which could explain such finding. The indication of vasectomy does not suggest a previous illness that would result in the couple's infertility; however, it is known that the time between vasectomy and the *in vitro* procedure may impact sperm collection and quality<sup>12</sup>.

The age of women from Group 2 was higher than in Group 1, corroborating the higher frequency of the procedure indicated for advanced age. In this study, we considered advanced female age when  $\geq 38$  years, provided that no other female indication was common to the couple in the procedure. It is well known that the female age has an important impact on ART<sup>13,14,15</sup>. De la Rochebrochard and Thonneau observed that the risk of miscarriage is not substantial if women are aged 20-29 years and were higher for women aged 30-34, regardless of the man's age. When both are older (women  $\geq 35$  years old and men  $\geq 40$  years old), the risk for abortion increases 1.97-fold<sup>15</sup>.

Endometriosis and ovarian factor indications were more prevalent in Group 1. It is important to note, however, that the indication “ovarian factor” may eventually encompass other adjacent indications of ovarian failure, anovulation and polycystic ovary, which also appear separately in the sample characterization. But no studies were found relating these indications to the male age, and these possible elements are subject to future studies.

When we analyzed the variables that comprise the couple, infertility without apparent cause was present in 17% of the ART procedures in our study, with the largest number in Group 1. According to the literature, infertility without apparent cause represents 10% of all causes of infertility in the world<sup>16</sup>. The indication for performing ART for PGT was higher in Group 2, most likely due to also advanced female age.

We observed lower motility and low seminal volume in Group 2, but no change in sperm concentration. This data has been demonstrated before in some studies<sup>17,18,19</sup>. In Fisch *et al.*,<sup>19</sup> the same trend was reported analyzing three semen banks in the US between 1970 and 1994, even adjusting the results for confounding withdrawal time confounders. Regarding sperm concentration, the decrease in volume may have influenced the count and masked its measurements. Another important factor is the possible interference of altered testicular function as age increases, in which there is a decrease in Leydig cells and testosterone production<sup>20, 21</sup>.

In Luna *et al.*,<sup>22</sup> there was a decline in fertilization rates when evaluating men aged  $\geq 50$  years. The same results are seen in Kaarouch *et al.*<sup>23</sup>. However, as in our study, effects on this parameter were observed from the age of 40 years. On the other hand, data from Frattarelli *et al.*,<sup>24</sup> corroborate our findings that, after

statistical adjustment for the female age factor, there was no difference between groups when the fertilization rate was evaluated.

Frattarelli *et al.* reported a decreased blastocyst rate in men over 50 years<sup>24</sup>. In contrast, our study showed no relationship between advanced male age and blastulation rates when adjusting for female age.

Although the aneuploidy and euploidy rates expressed an inversely proportional relationship as the male age increased in a primary analysis, when adjusting for female age these numbers did not remain significant. In a clinical analysis in 1991, a greater number of autosomal fetal aneuploidies were observed as the male age increased. However, the risk is not as great as that present when maternal age increases<sup>25</sup>. Although the data are conflicting, in the study by Antonarakis (1991)<sup>25</sup>, which evaluated the DNA of 200 families (each with a single child with chromosome 21 trisomy), approximately 5% of the trisomies were of paternal origin.

In 2015, García-Ferreyra *et al.* reported that embryos from men aged  $\geq 50$  years originated from sperm with more damaged DNA, demonstrating lower blastocyst development rates and higher aneuploidy rates compared to the ages of men  $\leq 39$  years or men aged 40 to 49 years old, pointing out as possible influencers the mitotic spindle alteration, decreased serum steroid levels, seminal volume, progressive sperm motility, decreased gamete production, decreased inhibin B/ follicle-stimulating hormone (FSH), testicular histological changes and increased of DNA fragmentation<sup>26</sup>. Carrasquillo *et al.*, who evaluated 1202 cycles using donated eggs and 6934 embryos evaluated by PGT, found no association between male age and embryo aneuploidies (monosomy, trisomy, partial deletion/duplication)<sup>27</sup>.

In this study, a greater number of embryonic transfers were observed in Group 1 when comparing to Group 2. On the other hand, a greater number of transfers on the third day of embryonic development was observed in Group 2, as well as a greater number of embryo transfer on the fifth day of development in Group 1. A study that analyzed 543 cycles of 439 couples undergoing ART between 2015 and 2017 in Italy, found that advanced male age reduces the chance of formation of A-class embryos (assessed at 48h, 72h, and 120h of culture), suggesting a negative effect of male age on the effectiveness of reproductive outcomes in terms of reduced number of type A embryos<sup>28</sup>. Embryo transfer to the uterus can occur on any evolutionary day of the embryo.

The fact that younger couples may have a larger number of laboratory-grown embryos and thus have a choice of a morphologically fit embryo may be influential in this regard, and fewer will matter for prior transfer to couples with advanced age. Even so, there is not enough evidence to suggest a better day for embryonic transfer, and this perspective depends on the specificity of each case and on obtaining suitable embryos for transfer. In 2016, for example, a study that analyzed 1225 first *In vitro* Fertilization (IVF) cycles conducted between 2012 and 2013 attempted to produce a model that would determine the ideal embryo transfer date for each couple. In conclusion, it eventually suggested that blastocyst transfer should be more widely offered and yet patients remain for whom cleavage stage transfer may produce better results<sup>29</sup>.

Regarding pregnancy rate, no statistical difference was observed between groups when adjusting for female age. In contrast, Klonoff-Cohen demonstrated a significant decrease in pregnancy rates with increasing male age, pointing out that each additional year of male age was associated with an 11% increased

chance of not becoming pregnant and a 12% probability of not having a successful delivery or associated with a gestational complication<sup>30</sup>.

As in our study, Klonoff-Cohen (2004) found no association between paternal age and embryonic fertilization results and live births<sup>30</sup>.

Evaluating neonatal outcomes, our study observed that the Apgar score at 5 minutes decreased in Group 2 for single and twin pregnancies, even when statistical adjustment was made for female age. The study by Astolfi *et al.* (2006), who evaluated 1.5 million births between 1990 and 1998 in Italy, found that newborns from parents aged 45 to 49 years are associated with a higher risk of severe prematurity (<32 weeks of gestation)<sup>31</sup>. On the other hand, a study conducted in Denmark, which included couples whose first child was born between 1980 and 1996, found that newborns from older parents were more likely to have suboptimal physical conditions after birth<sup>32</sup>.

In Sun *et al.* (2006)<sup>32</sup>, the link between advanced paternal age and Apgar was controversial, even though it is discerned that the paternal genetic contingent is fundamental for placental development and those chromosomal aberrations tend to increase with advancing age. The authors suggested that there is evidence that if the male age is linked to low offspring Apgar levels, factors such as smoking and lifestyle should be considered<sup>32</sup>.

It should be noted, however, that our study has a small sample to evaluate neonatal outcomes and that differences are noted according to the amplitude of the percentiles related mainly to the Apgar index of the analysis. Thus, further studies in this regard should be conducted.

In summary, the impact of the female age factor on assisted reproduction procedures is well proven and unquestionable, corroborated by the different



statistical associations demonstrated in the present study and previous studies in the world literature. However, our findings showed that advanced male age has an influence on semen volume and motility parameters of sperm.

Our study also suggests that the Apgar index may be inversely related to increased paternal age, even though more studies on this regard with a larger sample are necessary to eliminate bias.

## **CONCLUSION**

Advancing male age appears to have an influence in a couple of seminal factors such as sperm volume and motility and, although the female age factor is greater for those who want paternity, male age should not be ignored, especially for guidance and advice of possible future adventures in membership. Our findings reinforce that female age is the one that most impacts the immediate results of ART, thus agreeing with previous literature.

Further studies, however, are needed to exclude important confounding factors, especially those that analyze late offspring outcomes, leading to a better understanding of the male age factor in those individuals who will use ART.

## **Study Limitations**

Our study covers a database in which factors such as lifestyle, smoking and body mass index were not recorded in a standardized way, which may turn out to be a bias.

In addition, the data refers to immediate parameters and the medium and long term evolution of children with confirmed births could not be obtained, considering that the period of investigation was recent.

## **METHODS**

A retrospective cross-sectional study was conducted using a database from Fertilitat – Reproductive Medical Center, a private clinic from southern Brazil, with anonymized information from patients undergoing ART, between January 2015 and December 2018.

This study was approved by São Lucas Hospital/ Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul Ethics Committee (No. 3.183.998 /CAAE: 06046819.7.0000.5336). Data from sample characteristics and assisted Reproductive Technology indications; seminal parameters and embryonic evolution; embryo transfer and confirmed pregnancies, and pregnancy and neonatal outcomes were collected.

### **Assisted Reproductive Technology**

Patients who receive an indication for *in vitro* fertilization, after the couple's medical appointment, initiate controlled ovarian stimulation. The hormonal stimulus is defined by the attending physician respecting the specific characteristics of each patient, based on ovarian response prediction, which largely depends on a woman's ovarian reserve. Controlled ovarian stimulation (COS) with gonadotrophins is an essential part of in-vitro fertilization treatment. The aim is to produce an optimum number of oocytes to maximize success in the safest possible way. The COS is controlled by a series of ultrasound scans until the appropriate day for oocyte retrieval. On the day of the female procedure, semen collection is also performed. In the absence of sperm in the ejaculate,

PESA is indicated, and if necessary, TESA to obtain samples directly from the testicles. After obtaining the gametes, insemination is performed using Intracytoplasmic Sperm Injection (ICSI) technique.

The egg is inseminated and, once it has been fertilized, the embryo stage is monitored for up to seven days. Identifying embryos with the highest potential for transfer is an essential step to optimize ART outcomes. The pregnancy may be achieved following day 2, day 3, and day 5 embryo transfers (most procedures are performed on the third or fifth day of evolution).

This decision is specific for each couple and depends on the indication of the procedure, the amount of fertilized eggs, its quality and the evolution of the embryos obtained.

### **Participant selection**

This study included couples who sought care for infertility treatments. For analysis, the first follicle aspiration cycle for insemination with ICSI technique was included. Procedures using donor semen, cycles for freezing oocytes and those in which no eggs were obtained, as well as if they had lack of information in the database, were excluded from the study.

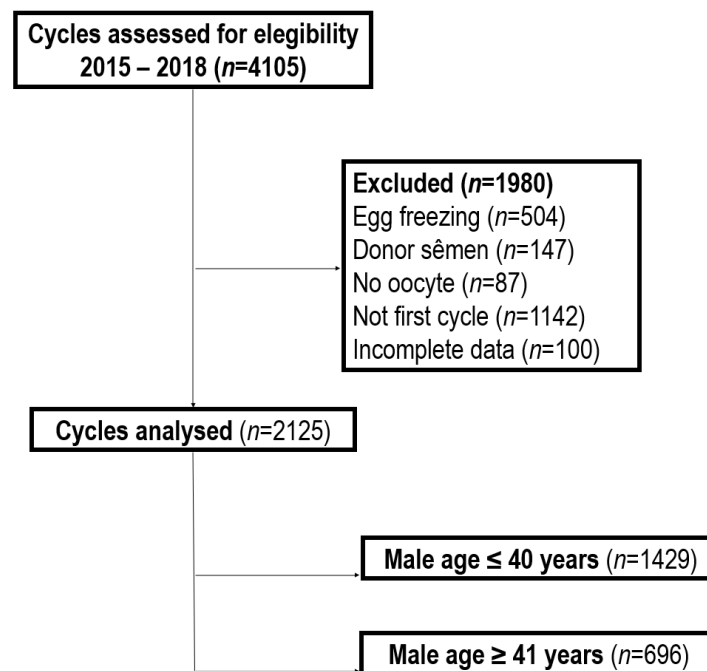
The sample was divided into two groups according to the male age: group 1,  $\leq 40$  years and group 2,  $\geq 41$  years. The laboratory quality indicators postulated in the Vienna Consensus<sup>33</sup> were used as the standard for laboratory data analysis.

## **Statistical Analysis**

Statistical tests were conducted using the Statistical Package for Social Sciences version 18 [SPSS Inc. Released in 2009. PASW Statistics for Windows version 18.0. Chicago: SPSS Inc.]. Quantitative variables were presented as mean  $\pm$  standard deviation (SD) or median and interquartile range (IQR) according to distribution by the Shapiro Wilk normality test. Mann–Whitney U-test and Student t test were used depending on the data distribution. For categorical variables, we used percentage and applied the Chi-square test or Fisher's exact test. Additionally, statistical adjustments for some variables of interest were made for “female age” and “vasectomy”, using Logistic Regression or Covariance Analyzes (ANCOVA), when applicable. The null hypothesis was rejected when  $p < 0.05$ .

## **Sample size**

The sample size was determined by WinPEPI (Programs for Epidemiologists for Windows) version 11.63, considering the frequency of the variable with the highest variability (clinical pregnancy) and using the ratio 0.30, as indicated by the analysis of the Latin American Assisted Reproduction Data Registry conducted in December 2017 by the Brazilian Society of Human Reproduction (SBRH)<sup>34</sup>. It was required 474 procedures for a power of 95%, a statistical significance of 5% and a loss estimate of 15%.

**Figure 1:** Sample selection.

**Table 1:** Statistical description of the sample and indication for Reproductive Technology indications

Variable	Total (N=2125)	Group 1 (n=1429)	Group 2 (n=696)	*p-value
<b>Male variables</b>				
Male age (years) – md[P25–P75] (min – max)	38,0[35,0–42,0] (24,0–73,0)	36,0[33,0–38,0] (24,0–40,0)	45,0[42,0–48,5] (41,0–73,0)	≤0,0001
Male indications** – n(n%)				
Asthenospermia	101(4,8)	71(5,0)	30(4,3)	0,575
Collection difficulty	1(0,0)	1(0,1)	0(0,0)	1,000
Nonobstructive azoospermia	62(2,9)	41(2,9)	21(3,0)	0,958
Obstructive azoospermia	8(0,4)	3(0,2)	5(0,7)	0,156
Oligospermia	404(19,0)	<b>289(20,2)</b>	115(16,5)	<b>0,048</b>
Paraplegia	6(0,3)	5(0,3)	1(0,1)	0,685
Retrograde ejaculation	1(0,1)	1(0,1)	2(0,3)	0,524
Teratospermia	34(1,6)	20(1,4)	14(2,0)	0,384
Vasectomy	51(2,4)	9(0,6)	<b>42(6,0)</b>	≤0,0001
Others (male factor)	30(1,4)	17(1,2)	13(1,9)	0,295
Sperm origin – n(n%)				
Ejaculated	1981(93,2)	<b>1364(95,5)</b>	617(88,6)	
Epididymis Aspiration	63(3,0)	14(1,0)	<b>49(7,0)</b>	≤0,0001
Testicular Biopsy	80(3,8)	50(3,5)	30(4,3)	
Sperm condition – n(n%)				
Fresh	2042(96,1)	1380(96,6)	662(95,1)	
Frozen	83(3,9)	49(3,4)	33(4,7)	0,113
Cooled	1(0,0)	0(0,0)	1(0,1)	
<b>Female variables</b>				
Female age (years) – md[P25–P75] (min – max)	36,0[33,0–39,0] (19,0–50,0)	35,0[33,0–38,0] (19,0–47,0)	39,0[36,0–41,0] (22,0–50,0)	≤0,0001
Female indications** – n(n%)				
Advanced age***	498(23,4)	195(13,6)	<b>303(43,5)</b>	≤0,0001
Anovulation	16(0,8)	12(0,8)	4(0,6)	0,692
Cervical Factor	7(0,3)	6(0,4)	1(0,1)	0,523
Endometriosis	323(15,2)	<b>238(16,7)</b>	85(12,2)	<b>0,009</b>
Frozen oocyte	3(0,1)	2(0,1)	1(0,1)	1,000
Ovarian factor	93(4,4)	<b>74(5,2)</b>	19(2,7)	<b>0,013</b>
Ovarian failure	4(0,2)	3(0,2)	1(0,1)	1,000
Peritoneal factor	13(0,6)	10(0,7)	3(0,4)	0,653
Polycystic ovary	30(1,4)	24(1,7)	6(0,9)	0,193
Tubal factor	312(14,7)	205(14,3)	107(15,4)	0,573
Others (female factor)	12(0,6)	10(0,7)	2(0,3)	0,378
<b>Couple variables</b>				
Indications** – n(n%)				
Embryo accumulation	5(0,2)	4(0,3)	1(0,1)	0,896
Genetic factor	45(2,1)	34(2,4)	11(1,6)	0,298
Infertility without apparent cause	382(18,0)	<b>297(20,8)</b>	85(12,2)	≤0,0001
Immune factor	1(0,0)	0(0,0)	1(0,1)	0,713
Intrauterine Insemination failure	18(0,8)	13(0,9)	5(0,7)	0,842
Lack of sexual intercourse	3(0,1)	2(0,1)	1(0,1)	1,000
Preimplantation Genetic Testing	346(16,3)	187(13,1)	<b>159(22,8)</b>	≤0,0001
Viral factor	26(1,2)	19(1,3)	7(1,0)	0,669

Legend: md – median. P25 – P75 – interquartile range (percentiles 25th – 75th). N – absolute frequency. n% – relative frequency. p – statistical significance index. \*Mann-Whitney Test or Chi-Square Test with adjusted residual analysis. Bold numbers show significant association for the Chi-Square Test with adjusted residual analysis in the highlighted categories. \*\* Up to three procedural indications are assigned per couple, and this table shows the number of times that indication was given.\*\*\*In this study, we considered advanced female age when ≥38 years, provided that no other female indication was common to the couple in the procedure

**Table 2:** Laboratory Data: seminal parameters and embryonic evolution.

Variable	Total (N=2125)	Group 1 (n=1429)	Group 2 (n=696)	*p-value
<b>Seminal Analysis</b>				
Seminal concentration (x10 <sup>6</sup> /mL) – md[P25–P75] <sup>a</sup> (min – max)	40,00[10,00–90,00] (0,00–400,00)	40,00[10,00–80,00] (0,00–400,00)	50,00[12,00–90,00] (0,00–400,00)	0,316
Seminal volume (mL) – md[P25–P75] <sup>b</sup> (min – max)	2,50[2,00 – 4,00] (0,20–11,00)	3,00[2,00–4,00] (0,30–11,00)	2,50[2,00–3,50] (0,20–8,00)	<b>0,001</b>
Sperm motility (%) – md[P25 – P75] <sup>c</sup> (min – max: 0,00 – 100,00)	60,00[50,00 – 72,00]	60,00[50,00 – 75,00]	60,00[40,00–70,00]	<b>0,001</b>
<b>Embryonic evolution adjusted for female age</b>				
2PN Rate (%) – md[P25–P75] (min – max)	80,00[60,00–100,00] (0,00–100,00)	80,00[60,00–100,00] (0,00–100,00)	80,00[60,00–100,00] (0,00–100,00)	0,815
Blastocyst rate (%) – md[P25–P75] <sup>d</sup> (min – max)	50,00[30,00–70,00] (0,00–100,00)	50,00[30,00–70,00] (0,00–100,00)	50,00[20,00–70,00] (0,00–100,00)	0,879
Euploidy Rate (%) – mean ± SEM <sup>e</sup> (min – max)	32,60 ± 3,30 (0,00–100,00)	34,00 ± 3,00 (0,00–100,00)	31,00 ± 3,00 (0,00–100,00)	0,426
Aneuploidy Rate (%) – mean ± SEM <sup>e</sup> (min – max)	67,51 ± 3,23 (0,00–100,00)	66,00 ± 2,50 (0,00–100,00)	69,30 ± 2,70 (0,00–100,00)	0,385

Legend: md – median. P25 – P75 – interquartile range (percentiles 25th – 75th). N – absolute frequency. p – statistical significance index. 2PN – eggs fertilized normally. \*P<0.05. <sup>a</sup>N=1981, Age ≤40 years old n=1364, Age ≥41 years old n=617. <sup>b</sup>N=1983, Age ≤40 years old n=1366, Age ≥41 years old n=617. <sup>c</sup>N=1969, Age ≤40 years old n=1356, Age ≥41 years old. n=613. <sup>d</sup>N=1598. Age ≤40 years old n=1115, Age ≥41 years old n=483. <sup>e</sup>N=312. Age ≤40 years old n=167, Age ≥41 years old n=145. Values adjusted for the analyzed outcome considering the covariate female age by Analysis of Covariance (ANCOVA). Presented data as mean ± standard error (SEM).



**Table 3:** Embryo transfer and confirmed pregnancies

Variable	Total (N=2125)	Group 1 (n=1429)	Group 2 (n=696)	*p-value
Transfer – n(n%)	1301(61,2)	<b>900(63,0)</b>	401(57,6)	<b>0,018</b>
Evolution day of the transfer embryo – n(n%)				
Day 2	78(6,0)	50(5,6)	28(7,0)	
Day 3	434(33,4)	260(28,9)	<b>174(43,4)</b>	<b>≤0,0001</b>
Day 4	72(5,5)	54(6,0)	18(4,5)	
Day 5	714(54,9)	<b>534(59,3)</b>	180(44,9)	
Day 6	3(0,2)	2(0,2)	1(0,2)	
Pregnancy adjusted for female age – n(n%)				
Yes	554(42,6)	399(44,3)	155(38,7)	0,876
Clinical pregnancy adjusted for female age – n(n%)				
Yes	484(37,2)	351(39,0)	133(33,2)	0,927
Gestational evolution adjusted for female age – n(n%)				
Miscarriage	89(18,4)	60(17,1)	29(21,8)	0,696
Ectopic	5(1,0)	4(1,1)	1(0,8)	0,383
Births	338(69,8)	245(69,8)	93(69,9)	0,883
Ongoing	52(10,7)	42(12,0)	10(7,5)	

Legend: n – absolute frequency. n% - relative frequency. p – statistical significance index. \*Chi-Square Test with adjusted residual analysis. \*p<0.05. Values adjusted for the analyzed outcome considering covariate female age by logistic regression models.

**Table 4:** Gestational and Neonatal Outcomes.

Variable	Total (N=2125)	Group 1 (n=1429)	Group 2 (n=696)	*p-value
Gestational age (weeks) – mean ± SEM (min – max)	37,42 ± 3,86 (6,00 – 41,00)	37,52 ± 0,25 (6,00 – 41,00)	37,14 ± 0,42 (6,00 – 41,00)	0,430
Mode of delivery – n(n%)				
Vaginal	27(6,9)	18(6,2)	9(8,7)	0,334
Cesarean	310(78,9)	227(78,5)	83(79,8)	
Ongoing	56(14,2)	44(15,2)	12(11,5)	
Genre NB1 – n(n%)				
Female	172(43,8)	129(44,6)	43(41,3)	0,330
Male	166(42,2)	116(40,1)	50(48,1)	
Ongoing	55(14,0)	44(15,2)	11(10,6)	
Birth weight NB1 at delivery (g) – mean ± SEM (min – max)	3002,00 ± 576,95 (570,0 – 4105,00)	3010,04 ± 37,42 (570,00 – 4105,00)	2980,37 ± 62,72 (800,00 – 4000,00)	0,690
Birth length NB1 at delivery (cm) – mean ± SEM (min – max)	47,74 ± 2,70 (33,00–53,00)	47,77 ± 0,18 (37,00–53,00)	47,63 ± 0,29 (33,00–53,00)	0,698
Apgar 1st minute NB1 – mean ± SEM (min – max)	8,87 ± 0,94 (3,00–10,00)	8,93 ± 0,06 (3,00–10,00)	8,73 ± 0,10 (4,00–10,00)	0,112
Apgar 5th minute NB1n – mean ± SEM (min – max)	9,32 ± 0,65 (5,00–10,00)	9,38 ± 0,04 (7,00–10,00)	9,19 ± 0,07 (5,00–10,00)	<b>0,021</b>

**Twin pregnancies (NB2)**

Genre NB2 – n(n%)					
	Female	24(22,9)	15(20,3)	9(29,0)	
	Male	26(24,8)	15(20,3)	11(35,5)	0,779
	Ongoing	55(52,4)	44(59,5)	11(35,5)	
Birth weight NB2 at delivery (g) – mean ± SEM (min –max)		2167,62±471,12 (780,00–3070,00)	2210,25 ± 88,38 (1405,00–3070,00)	2103,68 ± 108,94 (780,00–3046,00)	0,458
Birth length NB2 at delivery (cm) – mean ± SEM (min – max)		44,08±3,35 (33,00–49,00)	44,26±0,63 (40,00–49,00)	43,81±0,78 (33,00–49,00)	0,659
Apgar 1st minute NB2 – mean ± SEM (min – max)		8,52 ± 1,28 (3,00–10,00)	8,97 ± 0,22 (7,00–10,00)	7,84 ± 0,27 (3,00–10,00)	<b>0,002</b>
Apgar 5th minute NB2 – mean ± SEM (min – max)		9,04 ± 0,90 (5,00–10,00)	9,32 ± 0,16 (8,00–10,00)	8,62 ± 0,19 (5,00–10,00)	<b>0,008</b>

Legend: n – absolute frequency. n% - relative frequency. md – median. P25 – P75 – interquartile range (percentiles 25th – 75th). g – gram. cm – centimeter. NB – Newborn. p – statistical significance index. \*Chi-Square Test with adjusted residual analysis, Mann-Whitney Test or Student T-Test for independent samples. Significance set at 5% for all analyzes. Values adjusted for the analyzed outcome considering covariate female age by logistic regression models or by Analysis of Covariance (ANCOVA). Data presented as mean ± standard error of mean (SEM). Variables were adjusted for female age.

## REFERENCES

1. Harris, I.D. Effect of advanced paternal age on fertility and pregnancy. Simpson, L.L, Eckler, K., ed. UpToDate (2018).
2. Ramasamy, R.; Chiba, K., Butler, P.; *et al.* Male biological clock: a critical analysis of advanced paternal age. *Fertility and Sterility*, **103**, n. 6, p. 1402–1406 (2015).
3. Toriello, H. V.; Meck, J. M. Statement on guidance for genetic counseling in advanced paternal age. *Genetics in Medicine*, **10**, n. 6, p. 457–460 (2008).
4. Anawalt, B. D.; Page, S. T. Causes of male infertility. Mastumoto, A.M., Martin, K.A., ed. UpToDate (2017).
5. Slama, R.; Bouyer, J.; Windham, G.; *et al.* Influence of Paternal Age on the Risk of Spontaneous Abortion. *American Journal of Epidemiology*, **161**, n. 9, p. 816–823 (2005).
6. Alio, A. P.; Salihu, H. M.; Mcintosh, C.; *et al.* The Effect of Paternal Age on Fetal Birth Outcomes. *American Journal of Men's Health*, **6**, n. 5, p. 427–435 (2012).
7. Sharma, R.; Agarwal, A.; Rohra, V. K; *et al.* Effects of increased paternal age on sperm quality, reproductive outcome and associated epigenetic risks to offspring. *Reproductive Biology and Endocrinology*, **13**, n. 1 (2015).
8. Reichenberg, A.; Gross, R.; Weiser, M.; *et al.* Advancing Paternal Age and Autism. *Archives of General Psychiatry*, **63**, n. 9, p. 1026 (2006).
9. Frans, E. M.; La, N. Advancing Paternal Age and Bipolar Disorder. *Archives of General Psychiatry*, **65**, n. 9, p. 7 (2008).
10. Urhoj, S. K.; Jespersen, L. N.; Nissen, M.; *et al.* Advanced paternal age and mortality of offspring under 5 years of age: a register-based cohort study. *Human Reproduction*. **29**, n. 2, p. 343–350 (2014).
11. BRASIL. Lei n. 9.263, de 12 de Janeiro de 1996. Access: [http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/leis/l9263.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/l9263.htm).
12. Borges Júnior, E.; Rossi-Ferragut, L.M.; Pasqualotto, F.F.; Rocha, C.C.; Laconelli Júnior, A. Different intervals between vasectomy and sperm retrieval interfere in the reproductive capacity from vasectomized men. *J Assist Reprod Genet*; **20**:33-7 (2003).

13. Schwartz, D.; Mayaux, M.J. Female fecundity as a function of age: results of artificial insemination in 2193 nulliparous women with azoospermic husbands. Federation CECOS. N Engl J Med. Feb 18;**306**(7):404-6 (1982).
14. Eisenberg, V. H.; Schenker, J. G. Pregnancy in the older woman: scientific and ethical aspects. International Journal of Gynecology & Obstetrics, **56**(2), 163–169 (1997).
15. de La Rochebrochard, E.; Thonneau, P. Paternal age and maternal age are risk factors for miscarriage; results of a multicentre European study. Human Reproduction, **17**(6), 1649–1656 (2002).
16. Speroff, L.; Fritz, M. The clinical gynecologic endocrinology and infertility. 7th Edition, Ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia (2005).
17. Auger, J.; Kunstmann, J. M.; Zyglick, F.; *et al.* Decline in Semen Quality Among Fertile Men in Paris During the Past 20 Years. The New England Journal of Medicine. **332**. Num 5. 281-285 (1995).
18. 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, **75**(2), 237–248 (2001).
19. Fisch, H.; Goluboff, E. T.; Olson, J. H.; Feldshuh, J.; Broder, S. J.; Barad, D. H. Semen analyses in 1,283 men from the United States over a 25-year period: no decline in quality. Fertility and Sterility, **65**(5), 1009–1014 (1996).
20. Dain, L.; Auslander, R.; Dirnfeld, M. The effect of paternal age on assisted reproduction outcome. Fertility and Sterility, **95**(1), 1–8 (2011).
21. Paniagua, R.; Nistal, M.; Sáez, F. J.; Fraile, B. Ultrastructure of the aging human testis. Journal of Electron Microscopy Technique, **19**(2), 241–260 (1991).
22. Luna, M.; Finkler, E.; Barritt, J.; Bar-chama, N.; Sandler, B.; Copperman B.; *et al.* Paternal age and assisted reproductive technology outcome in ovum recipients. Fertil Steril. **92**:1772–5 (2009).
23. Kaarouch, I.; Bouamoud, N.; Madkour, A.; Louanjli, N.; Saadani, B.; Assou, S.; *et al.* Paternal age: negative impact on sperm genome decays and IVF outcomes after 40 years. Mol Reprod Dev. **85**:271–80 (2018).
24. Frattarelli, J.L.; Miller, K.A.; Miller, B.T.; Elkind-Hirsch, K.; Scott, R.T. Male age negatively impacts embryo development and reproductive outcome in donor oocyte assisted reproductive technology cycles. Fertil Steril. Jul. **90**(1):97-103 (2008).

25. Antonarakis, S.E. Parental origin of the extra chromosome in trisomy 21 as indicated by analysis of DNA polymorphisms. Down Syndrome Collaborative Group. *N Engl J Med.* **324**:872 (1991).
26. García-Ferreyra, J.; Luna, D.; Villegas, L.; *et al.* High Aneuploidy Rates Observed in Embryos Derived from Donated Oocytes are Related to Male Aging and High Percentages of Sperm DNA Fragmentation. *Clin Med Insights Reprod Health.* **9**:21 (2015).
27. Carrasquillo, R. J.; Kohn, T. P.; Cinnioglu, C.; Rubio, C.; Simon, C.; Ramasamy, R.; Al-Asmar, N. Advanced paternal age does not affect embryo aneuploidy following blastocyst biopsy in egg donor cycles. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* (2019).
28. Gallo, M.; Licata, E.; Meneghini, C.; Dal Lago, A.; Fabiani, C.; Amodei, M.; Rago, R. Impact of Paternal Age on Seminal Parameters and Reproductive Outcome of Intracytoplasmic Sperm Injection in Infertile Italian Women. *Frontiers in Endocrinology.* **10** (2019).
29. Goldman, R. H.; Kaser, D. J.; Missmer, S. A.; Srouji, S. S.; Farland, L. V.; Racowsky, C. Building a model to increase live birth rate through patient-specific optimization of embryo transfer day. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, **33**(11), 1525–1532 (2016).
30. Klonoff-Cohen, H.S.; 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.* **191**:507–514 (2004).
31. Astolfi, P.; De Pasquale, A.; Zonta, L.A. Paternal age and preterm birth in Italy, 1990 to 1998. *Epidemiology.* **17**:218-21 (2006).
32. Sun, Y.; Vestergaard, M.; Zhu, J.L.; Madsen, K.M.; Olsen, J. Paternal age and Apgar scores of newborn infants. *Epidemiology.* **17**:473-474 (2006).
33. The Vienna consensus: report of an expert meeting on the development of art laboratory performance indicators. *Human Reproduction Open* (2017).
34. Sociedade Brasileira de Reprodução Humana (SBRH). Análise dos registros de dados da América Latina em reprodução assistida (December, 2017).

## DECLARATIONS

### *Ethics approval*

This study was approved by the Ethics Committee of São Lucas Hospital (SLH)/ Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul (PUCRS), and it is registered under the number 3.183.998 and CAAE: 06046819.7.0000.5336.

### *Consent for publication*

Not applicable.

### *Availability of data and material*

The datasets used and analyzed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

### *Competing interests*

The authors declare that they have no competing interests.

### *Funding*

The researchers funded this study.

### *Authors' contributions*

BC, MFJ, MTVS, MRH, RMA, CT, AP and MB were responsible for the planning and execution of the project. BC and CFF were responsible for the data analysis and statistical analysis.

BC, MRH and MTVS were responsible for ethical committee approval. BC, MTVS, MB and MFJ were responsible for the planning of the project and draft of the manuscript.



## **8. CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Ainda que o avanço da idade masculina e ou paterna seja um critério de difícil estudo, se mostra importante influenciador nos parâmetros seminais de volume e motilidade de espermatozoides.

No entanto, para a maioria dos desfechos já estudados, o fator idade feminina desempenha maior magnitude para quem deseja a concepção. Nossos achados reforçam que a idade feminina tem maior impacto nos resultados imediatos de RA, concordando assim com a literatura prévia. Apesar disso, a idade masculina não deve ser ignorada, principalmente para orientação e aconselhamento de possíveis adventos futuros na filiação.

Mais estudos, no entanto, são necessários para que se excluam fatores de confusão importantes. Além disso, estudos que analisem desfechos de prole tardios devem ocorrer para que haja um melhor entendimento do fator idade masculina naqueles indivíduos que venham a utilizar a RA.

## 9. PERSPECTIVAS

A descoberta da possível relação do avanço da idade masculina e seus efeitos na prole, relacionadas às técnicas de RA, ainda é inicial e deve ser avaliado com cautela. Estudos que indicam aumento de taxas de autismo, bipolaridade e ainda de mutações *de novo* na prole são muito importantes para que haja o correto manejo e aconselhamento de casais com idade mais avançada, que desejam a paternidade. Dessa forma, maiores estudos que avaliem os nascimentos decorrentes destas técnicas são necessários para que se entenda os efeitos a médio e longo prazo que o fator de estudo pode acarretar.

Tendo a consciência de que o envelhecimento reprodutivo e o atraso na concepção é uma tendência mundial, devido a fatores sociológicos e comportamentais, o risco do desenvolvimento de disfunções e doenças influenciadas pela idade masculina não deve ser ignorado.

Assim, a continuidade deste trabalho, bem como a melhoria da seleção de participantes e as novas formas de avaliação e coleta de dados específica devem ocorrer. A comparação entre diferentes idades e o alojamento de amostra em diferentes grupos, a fim de medir e contrastar os efeitos do fator de estudo em diferentes situações, podem ser realizadas de maneira que se excluam os vieses analíticos da melhor forma possível, principalmente para exclusão do fator de confusão de idade feminina neste contexto.

## 10. ANEXOS

### 10.1. Termo de Compromisso de Utilização de Dados (TCUD).

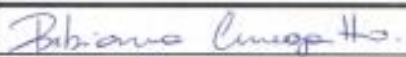

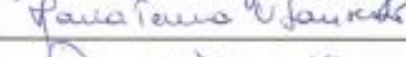

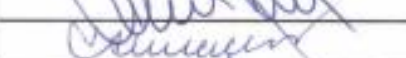
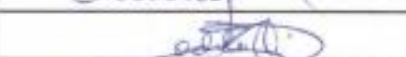

#### Termo de Compromisso de Utilização de Dados (TCUD)

Nós, abaixo assinado(s), pesquisadores envolvidos no projeto de título "Impacto da idade paterna avançada em desfechos de procedimentos de Reprodução Assistida em uma clínica de fertilização do sul do Brasil", nos comprometemos a manter a confidencialidade sobre os dados coletados, bem como a privacidade de seus conteúdos, como preconizam os Documentos Internacionais e a Resolução N° 466/12 do Conselho Nacional de Saúde.

Informamos que os dados a serem coletados dizem respeito a base de dados/prontuários de procedimentos de fertilização de uma clínica de fertilização assistida, ocorridos entre o período dos anos de 2012 a 2018.

Porto Alegre, 03 de Janeiro de 2019.

Envolvidos na manipulação e coleta dos dados:

Nome completo	Assinatura
Bibiana Cunegatto	
Mirela Foresti Jimenez	
Maria Teresa Vieira Sanseverino	
Marta Ribeiro Hentschke	
Claudio Telöken	
Alvaro Petracco	
Mariangela Badalotti	

## 10.2. Carta de Aceite do Comitê de Ética em Pesquisa PUCRS.

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE  
CATÓLICA DO RIO GRANDE  
DO SUL - PUC/RS



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Impacto da idade paterna avançada em desfechos de procedimentos de Reprodução Assistida em uma clínica de fertilização do sul do Brasil

**Pesquisador:** MARIA TERESA VIEIRA SANSEVERINO

**Área Temática:**

**Versão:** 1

**CAAE:** 06046819.7.0000.5336

**Instituição Proponente:** UNIÃO BRASILEIRA DE EDUCAÇÃO E ASSISTENCIA

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 3.183.998

#### Apresentação do Projeto:

É sabido que mulheres com idade superior a 38 anos são classificadas como tendo "idade materna avançada". Em oposição a isso, não há consenso sobre qual idade pode ser considerada avançada em homens que desejam a paternidade. Embora haja necessidade de mais estudos com base no avanço da idade paterna, sabe-se que o envelhecimento reprodutivo masculino pode afetar uma série de coeficientes determinantes para o resultado direto dos tratamentos de fertilização in vitro. Este estudo pretende utilizar uma base de dados préformada para analisar e correlacionar os efeitos da idade paterna nesses procedimentos, assim como seus desfechos gestacionais, parâmetros laboratoriais, desfechos clínicos - como taxas de gestação (bioquímica e clínica), gestação acumulada, número de nascidos vivos e taxa de abortos - e também descrever anormalidades cromossômicas e sua taxa de ocorrência, associando esses achados com dados preexistentes na literatura. Para este estudo, serão analisados dados de uma clínica privada de FIV em Porto Alegre-RS-Brasil entre os anos de 2012 a 2018.

#### Objetivo da Pesquisa:

**Objetivo Primário:**

Relacionar a idade paterna com desfechos de procedimentos em fertilização in vitro.

**Objetivo Secundário:**

Verificar se a idade paterna avançada tem influência nos seguintes parâmetros:- Taxa de óvulos

**Endereço:** Av.Ipiranga, 6681, prédio 50, sala 703

**Bairro:** Partenon

**CEP:** 90.619-000

**UF:** RS

**Município:** PORTO ALEGRE

**Telefone:** (51)3320-3345

**Fax:** (51)3320-3345

**E-mail:** cep@pucrs.br

Continuação do Parecer: 3.183.998

fertilizados por ciclo.- Qualidade da evolução embrionária, conforme número de blastocistos gerados.- Volume seminal.- Concentração espermática.- Motilidade dos espermatozoides.- Taxa de gestação (bioquímica e clínica).- Taxa de nascituros.- Taxa de abortamentos.- Resultados de análise cromossômica de biópsia embrionária.-

Ocorrência de anomalias cromossômicas.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

**Riscos:**

Os riscos implicados aos pacientes selecionados para este trabalho são mínimos e, por se tratar de um estudo transversal retrospectivo e utilizar um banco de dados já anonimizado da clínica de origem, elimina-se a possibilidade de vazamento de informações confidenciais. Além disso, o termo de comprometimento de uso de dados (TCUD) será assinado pela equipe de pesquisadores para que informações contidas no banco de dados sejam protegidas.

**Benefícios:**

Já é bem comprovado o efeito deletério da idade materna avançada no resultado da fertilização assistida. Por outro lado, as evidências sobre idade paterna avançada ainda são inconclusivas, uma vez que há dados apontando tanto a favor da existência deste efeito negativo, quanto contra. Além disso, todos os estudos disponíveis foram realizados em países europeus, norte-americanos e asiáticos. Dessa forma, são necessários dados

práticos e válidos no Brasil, fazendo-se imprescindível que haja suprimento desta falta.

Os resultados deste estudo podem vir a ser úteis para a área de fertilização assistida, na elaboração de novas técnicas para e um novo método de aconselhamento para casais que desejem o aumento familiar e estejam em idade avançada.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Sem comentários adicionais.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Os termos estão de acordo.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Não há pendências.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Diante do exposto, o CEP-PUCRS, de acordo com suas atribuições definidas na Resolução CNS n° 466 de 2012 e a Norma Operacional n° 001 de 2013 do CNS, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto.

**Endereço:** Av. Ipiranga, 6681, prédio 50, sala 703  
**Bairro:** Partenon **CEP:** 90.619-900  
**UF:** RS **Município:** PORTO ALEGRE  
**Telefone:** (51)3320-3345 **Fax:** (51)3320-3345 **E-mail:** cep@pucls.br

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE  
CATÓLICA DO RIO GRANDE  
DO SUL - PUC/RS



Continuação do Parecer: 3.183.998

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1284371.pdf	19/01/2019 17:39:17		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_PaternalAge.pdf	19/01/2019 17:35:50	BIBIANA CUNEGATTO	Aceito
Outros	Encaminhamento_CEP.jpeg	18/01/2019 16:54:40	BIBIANA CUNEGATTO	Aceito
Outros	Lattesautores_PaternalAge_2019.pdf	18/01/2019 16:50:40	BIBIANA CUNEGATTO	Aceito
Orçamento	Orcamento_PaternalAge_2019.jpeg	18/01/2019 16:48:15	BIBIANA CUNEGATTO	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Conhecimento_PaternalAge_2019.pdf	15/01/2019 20:20:27	BIBIANA CUNEGATTO	Aceito
Outros	Justificativa_PaternalAge_2019.pdf	14/01/2019 16:37:02	BIBIANA CUNEGATTO	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCUD_PaternalAge_2019.pdf	14/01/2019 16:35:49	BIBIANA CUNEGATTO	Aceito
Folha de Rosto	FolhaRosto_PaternalAge_2019.pdf	14/01/2019 16:35:01	BIBIANA CUNEGATTO	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

PORTO ALEGRE, 06 de Março de 2019

Assinado por:  
Paulo Vinicius Sporleder de Souza  
(Coordenador(a))

Endereço: Av. Ipiranga, 6681, prédio 50, sala 703  
 Bairro: Partenon CEP: 90.619-900  
 UF: RS Município: PORTO ALEGRE  
 Telefone: (51)3320-3345 Fax: (51)3320-3345 E-mail: cep@puers.br

## 10.3. Aprovação do projeto na Plataforma Brasil.

BRASIL Simplifique! Participe Acesso à informação Legislação Canais

Plataforma Brasil principal sair

Público Pesquisador Alterar Meus Dados BIBIANA CUNEGATTO - Pesquisador | V3.2  
Sua sessão expira em: 34min 39

Cadastros

### GERIR PESQUISA

Para cadastrar um novo projeto, clique aqui: [Nova Submissão](#) Para cadastrar projetos aprovados anteriores à Plataforma Brasil, clique aqui: [Projeto anterior](#)

#### BUSCAR PROJETO DE PESQUISA:

Título do Projeto de Pesquisa:  CAAE:

Pesquisador Responsável:  Última Modificação:  Tipo de Projeto:

Palavra-chave:

#### SITUAÇÃO DA PESQUISA

Marcar Todas

Aprovado  Não Aprovado no CEP  Recurso Submetido ao CEP

Em Apreciação Ética  Pendência Documental Emitida pela CONEP  Recurso Submetido à CONEP

Em Edição  Pendência Documental Emitida pelo CEP  Recurso não Aprovado no CEP

Em Recepção e Validação Documental  Pendência Emitida pela CONEP  Retirado

Não Aprovado - Não Cabe Recurso  Pendência Emitida pelo CEP  Retirado pelo Centro Coordenador

Não Aprovado na CONEP

#### LISTA DE PROJETOS DE PESQUISA:

Tipo	CAAE	Versão	Pesquisador Responsável	Comitê de Ética	Instituição	Origem	Última Apreciação	Situação	Ação
P	06046819.7.0000.5336	1	MARIA TERESA VIEIRA SANSEVERINO	S336 - Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul - PUCIRS		PO	PO	Aprovado	

#### LEGENDA:

(\*) Tipo  
P = Projeto de Centro Coordenador Pp = Projeto de Centro Participante Pc = Projeto de Centro Coparticipante

(\*) Formação do CAAE

Ano de submissão do Projeto    Tipo do centro    Código do Comitê que está analisando o projeto

Sequencial para todos os Projetos submetidos para apreciação    Dígito verificador    Sequencial, quando estudo possui Centro(s) Participante(s) e/ou Coparticipante(s)

(\*) Origem / Última Apreciação

PO = Projeto Original de Centro Coordenador	POp = Projeto Original de Centro Participante	POc = Projeto Original de Centro Coparticipante
E = Emenda de Centro Coordenador	Ep = Emenda de Centro Participante	Ec = Emenda de Centro Coparticipante
N = Notificação de Centro Coordenador	Np = Notificação de Centro Participante	Nc = Notificação de Centro Coparticipante

(\*) Lista de Projetos de Pesquisa  
- A exibição da ação indica que existem uma ou mais emendas em fila, ou seja, que aguardam apreciação.