

MARCELO BORGES CAVALCANTE¹

MARCELO DE PONTES ROCHA¹

MARJORIE LUZIA CUSTÓDIO MOTA DIAS¹

OSWALDO JOSÉ QUEIROZ DIAS¹

DANIELLE OLIVEIRA DE ARAÚJO SOUZA²

IARA GONÇALVES ROBERTO²

Interferência da idade sobre a qualidade seminal

Interference of age on semen quality

Artigos originais

Palavras-chave

Grupos etários
Contagem de espermatozoides
Sêmen
Motilidade espermática
Morfologia

Keywords

Age groups
Sperm count
Semen
Sperm motility
Morphology

Resumo

OBJETIVO: avaliar a influência da idade sobre a qualidade seminal de homens com quadro de infertilidade conjugal submetidos a análises espermáticas em um serviço de reprodução humana. **MÉTODOS:** estudo retrospectivo, no qual foram avaliados os espermogramas de todos os homens em processo de investigação para infertilidade conjugal no período de Setembro de 2002 a Dezembro de 2004, em um serviço de reprodução assistida do nordeste do Brasil. Foram incluídos 531 indivíduos submetidos a 531 avaliações espermáticas. Foram analisados os seguintes parâmetros: volume, concentração, motilidade e morfologia espermática. O total de investigados foi dividido em grupos, de acordo com resultados obtidos de cada variável estudada. Os grupos referentes ao volume seminal foram: hipoespermia, normoespermia e hiperespermia. Os grupos referentes à concentração espermática foram: azoospermia, oligospermia, normospermia e poliespermia. Os grupos referentes à motilidade foram: motilidade normal e astenospermia. Os grupos referentes à morfologia foram: morfologia normal e teratospermia. As médias das idades dos pacientes entre os grupos com parâmetros normais foram comparadas com as de grupos alterados, sendo utilizado o teste *t*. Para análise estatística, foi utilizado o programa XLSTAT ($p < 0,05$). **RESULTADOS:** os indivíduos estudados tinham média de idade de $37 \pm 7,9$ anos, com um volume seminal médio de $3 \pm 1,4$ mL, uma concentração espermática de $61,4 \pm 66,4$ espermatozoides por mL de sêmen, motilidade progressiva de $44,7 \pm 19,4\%$ do total de espermatozoides e morfologia normal de $11,2 \pm 6,6\%$ dos espermatozoides. As médias de idade entre os grupos foram semelhantes, exceto a média dos indivíduos com hipoespermia, que foi significativamente maior que a dos homens com normoespermia ($39,6 \pm 10,3$ versus $36,5 \pm 7,3$, $p = 0,001$). **CONCLUSÕES:** a idade interfere, de forma inversamente proporcional, sobre o volume do ejaculado, porém não exerce influência na concentração, motilidade e morfologia espermática.

Abstract

PURPOSE: to evaluate the influence of age on the quality of semen in men submitted to spermiatic analysis in a human reproduction service, in cases of conjugal infertility. **METHODS:** a retrospective study in which the spermiograms of all men in process of investigation for conjugal infertility in a service of assisted reproduction in the Northeast of Brazil were evaluated from September 2002 to December 2004. A number of 531 individuals submitted to 531 spermiatic evaluations were included in the study. The following parameters have been analyzed: spermiatic volume, concentration, motility and morphology. The men under investigation have been divided in groups, according to the results obtained in each of the variables studied. Seminal volume groups were divided in: hypospermia, normospermia and hyperspermia. Spermiatic concentration groups were divided in: azoospermia, oligospermia, normospermia and polyspermia. Motility groups were divided in: normal motility and asthenospermia. Morphology groups were divided in: normal morphology and teratospermia. The *t* test has been used to compare the average age of patients in groups with normal and in groups with altered parameters. The program XLSTAT ($p < 0.05$) has been used for the statistical analysis. **RESULTS:** the individuals studied presented an average of 37 ± 7.9 years old, with an average of seminal volume of 3 ± 1.4 mL, a spermiatic concentration of 61.4 ± 66.4 spermatozoids by mL of semen, a progressive motility of $44.7 \pm 19.4\%$ of the total of spermatozoids and normal morphology of $11.2 \pm 6.6\%$ of the spermatozoids.

Correspondência:

Marcelo Borges Cavalcante
Rua Cel Linhares, 950, sala 307 – Meirelles
CEP 60170-240 – Fortaleza/CE
Fone/fax: (85) 3246-0454
E-mail: cavalcantemb@secrel.com.br

Recebido

25/6/08

Aceito com modificações

24/11/08

Trabalho realizado no Centro de Reprodução Assistida do Ceará – Conceptus, Fortaleza (CE), Brasil.

¹ Médicos Ginecologistas do Centro de Reprodução Assistida do Ceará – Conceptus, Fortaleza (CE), Brasil.

² Biólogas do Centro de Reprodução Assistida do Ceará – Conceptus, Fortaleza (CE), Brasil.

Average age among groups were similar, except for that of individuals with hypospermia, which was significantly higher than the one from men with normospermia (39.6 ± 10.3 versus 36.5 ± 7.3 , $p=0.001$). **CONCLUSIONS:** age interferes in an inversely proportional way on the ejaculated volume, but does not influence spermatic concentration, motility and morphology.

Introdução

É definido como infértil o casal que não consegue engravidar após um ano com atividade sexual regular e sem nenhum método anticoncepcional. Em média, 8 a 10% dos casais em idade reprodutiva apresentam dificuldade de engravidar¹. Entre os casais inférteis, os fatores masculinos e femininos, isoladamente, são responsáveis por cerca de 35% dos casos; a associação dos fatores anteriores, por 20%; e, em cerca de 10% dos casos, não é diagnosticado um fator responsável².

A partir do final da década de 1970, na maioria dos países desenvolvidos, foram observadas modificações no comportamento reprodutivo. Ocorreu uma redução no número de filhos por casais e um aumento da média de idade no nascimento do primeiro filho, tanto entre os homens quanto entre as mulheres³. Nos Estados Unidos, houve aumento de 24% nos nascimentos de bebês filhos de homens entre 35 e 54 anos, desde a década de 1980³.

Os efeitos da idade sobre a capacidade reprodutiva da mulher já são bem conhecidos⁴. No homem, porém, a influência da idade na produção e na qualidade seminal ainda é pouco conhecida. Acredita-se que não somente a idade interfira diretamente na função reprodutiva, mas que as infecções urogenitais, as doenças vasculares e o acúmulo de substâncias tóxicas possam também contribuir para a deterioração dos parâmetros seminais⁵. Estudo recente, que avaliou 8.515 gestações planejadas, observou que homens com mais de 35 anos apresentaram possibilidade 50% menor de serem pais quando comparados a homens com menos de 25 anos⁵.

Várias pesquisas procuram avaliar as alterações no espermograma de acordo com a idade, porém os resultados são bastante variados. Fatores ambientais, doenças crônicas e diferentes períodos de abstinência sexual são alguns dos fatores que prejudicam a seleção dos indivíduos analisados, comprometendo as conclusões desses estudos⁶.

A análise de diferentes grupos de indivíduos, inférteis ou não, revela a interferência da idade na qualidade seminal. Recentemente, foi observada redução anual de 0,03 mL no volume de sêmen e de 0,7% na motilidade entre homens sem problemas de fertilidade entre 22 e 80 anos⁷. Um grande estudo de homens inférteis descreveu a influência da idade somente no volume espermático⁸.

As avaliações com melhores controles metodológicos sugerem que a idade reduz o volume seminal, o percentual de espermatozoides móveis e o percentual de espermatozoides com morfologia normal, não interferindo na concentração seminal⁶.

A idade do homem também interfere nos resultados gestacionais de casais com dificuldade em engravidar⁹. Estudo recente, que avaliou os resultados de mais de 17.000 inseminações artificiais, observou redução nas taxas de gravidez de 12,3% entre homens com menos de 30 anos e de 9,3% entre homens com mais de 45 anos. Também foi descrita uma relação diretamente proporcional na ocorrência de aborto espontâneo e idade paterna⁹.

Diante desse novo perfil reprodutivo masculino, é importante compreender melhor os efeitos da idade do homem na produção seminal. O objetivo desse estudo foi avaliar a influência da idade sobre a qualidade do sêmen de homens submetidos à investigação para infertilidade conjugal.

Métodos

Estudo retrospectivo, que incluiu todas as análises espermáticas de um serviço de reprodução humana do nordeste do Brasil, no período de Setembro de 2002 a Dezembro de 2004. Este exame é solicitado no protocolo de investigação de casais com quadro de infertilidade conjugal.

Foram incluídos 531 estudos seminais, normais e alterados, de 531 homens com histórico de infertilidade conjugal. Para a realização do exame, os pacientes foram orientados a ter um período de abstinência sexual entre três e sete dias. As amostras de sêmen foram coletadas em ambiente e com recipientes apropriados, sendo, em seguida, encaminhadas para análise, conforme protocolo e critérios estabelecidos pela Organização Mundial de Saúde (OMS)¹⁰ e por Krüger et al.¹¹, para morfologia.

O volume da amostra foi determinado com auxílio de uma pipeta graduada, utilizada para transferência do sêmen liquefeito para um tubo cônico graduado. O volume normal da amostra seminal, normoespermia, varia entre 2 e 5 mL. Amostras com volume menor que 2 mL foram definidas como hipospermia, e, quando o volume foi maior que 5 mL, como hiperespermia.

A concentração espermática foi determinada com a contagem em câmara de Makler e definida conforme critérios da OMS¹⁰:

- normozoospermia: concentração $\geq 20 \times 10^6$ espermatozoides/mL;
- oligozoospermia: $< 20 \times 10^6$ espermatozoides/mL;
- polizoospermia: $\geq 200 \times 10^6$ espermatozoides/mL;
- azoospermia: nenhum espermatozoide no ejaculado.

A motilidade foi avaliada em microscopia óptica, seguindo as recomendações da OMS¹⁰, com um aumento

de 400 vezes, sendo os espermatozoides classificados em: tipo A (espermatozoides com progressão linear rápida), tipo B (espermatozoides com progressão lenta linear ou não), tipo C (espermatozoides móveis sem progressão) e tipo D (espermatozoides imóveis). Foram consideradas com motilidade espermática normal as amostras com mais de 50% dos espermatozoides com motilidade tipos A e B, somados. Indivíduos com a motilidade espermática menor que 50% do total foram incluídos no grupo com astenospermia.

Os critérios de Krüger et al.¹¹ para avaliação da morfologia espermática normal foram: a cabeça do espermatozoide deve ser lisa e oval; o eixo longo da cabeça deve ter entre 5 e 6 μ , enquanto o eixo curto entre 2,5 e 3,5 μ ; o acrossoma deve cobrir 40 a 60% da cabeça do espermatozoide; não pode existir anomalia de peça intermediária ou cauda, e a peça intermediária deve ter menos que 1 μ de largura e até uma vez e meia o comprimento da cabeça do espermatozoide. Considera-se morfologia espermática normal a presença de pelo menos 14% de espermatozoides com as características acima descritas. De cada amostra, foram avaliados pelo menos 200 espermatozoides escolhidos ao acaso, com um aumento de 1.000 vezes.

O total de investigados foi dividido em grupos, de acordo com resultados obtidos de cada parâmetro estudado. Os grupos referentes ao volume seminal foram: hipoespermia, normoespermia e hiperespermia. Os grupos referentes à concentração espermática foram: azoospermia, oligoespermia, normoespermia e poliespermia. Os grupos referentes à motilidade foram: motilidade normal e astenospermia. Os grupos referentes à morfologia foram: morfologia normal e teratospermia.

O protocolo de avaliação espermática foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará (UFC), bem como pelo corpo clínico do Centro de Reprodução Assistida do Ceará - Conceptus. Foram comparadas as médias de idade entre os grupos com parâmetros espermáticos normais e alterados, bem como o período de abstinência prévio à coleta, sendo utilizado o teste *t*. O programa XLSTAT foi utilizado para realizar as análises estatísticas.

Resultados

A média de idade do total de homens estudados foi 37 \pm 7,9 anos (variação: 18 a 81 anos). A distribuição, de acordo com grupos etários, demonstrou que 56% dos indivíduos tinham entre 30 e 39 anos de idade (Tabela 1). O volume médio da amostra seminal foi 3 \pm 1,4 mL (0,2 a 8 mL). A concentração média foi 61,4 \pm 66,4 milhões de espermatozoides por mL de sêmen (0 a 500 milhões/mL). A motilidade normal (espermatozoides tipos A+B) média foi 44,7 \pm 19,4% do total de espermatozoides da amostra

(0 a 89). A morfologia normal média foi 11,2 \pm 6,6% do total de espermatozoides da amostra (0 a 32). Em média, a abstinência sexual prévia à avaliação espermática foi 4,4 \pm 2,6 dias, não havendo diferença estatística entre os diferentes grupos etários (Tabela 2), bem como entre os diferentes grupos com alterações seminais (Tabela 3).

O volume das amostras de sêmen foi normal em 73,6% dos indivíduos; esteve abaixo de 2 mL em 18,4% e acima de 5 mL em 5% das amostras avaliadas. O grupo com hipoespermia apresentou uma idade média significativamente mais elevada quando comparado com o grupo com volume normal (Tabela 3).

Tabela 1 - Distribuição dos indivíduos de acordo com a faixa etária

| Grupo | n | % | Média | dp |
|----------------|-----|------|-------|-----------|
| 18-24 anos | 16 | 3,0 | 22,9 | \pm 2,1 |
| 25-29 anos | 63 | 11,9 | 27,2 | \pm 1,5 |
| 30-34 anos | 135 | 25,2 | 32,0 | \pm 1,4 |
| 35-39 anos | 164 | 30,9 | 37,1 | \pm 1,4 |
| 40-44 anos | 85 | 16,0 | 41,7 | \pm 1,4 |
| 45-49 anos | 33 | 6,2 | 46,8 | \pm 1,4 |
| 50-54 anos | 20 | 3,8 | 52,0 | \pm 1,5 |
| 55-59 anos | 8 | 1,6 | 57,0 | \pm 1,7 |
| \geq 60 anos | 7 | 1,4 | 66,0 | \pm 7,9 |
| Total | 531 | 100 | 37 | \pm 7,9 |

dp=desvio padrão.

Tabela 2 - Características seminais da população incluída no estudo

| Variáveis seminais | n | Média | dp |
|--|-----|-------|-------------|
| Idade (anos) | 531 | 37 | \pm 7,9 |
| Volume seminal (mL) | 523 | 3,0 | \pm 1,4 |
| Concentração ($\times 10^6$ espermatozoides/mL) | 531 | 61,4 | \pm 66,4 |
| Motilidade A+B (%) | 512 | 44,7 | \pm 19,4 |
| Morfologia normal (%) | 386 | 11,2 | \pm 6,6 |
| Concentração total ($\times 10^6$ espermatozoides/mL) | 530 | 169,8 | \pm 191,4 |
| Abstinência sexual (dias) | 528 | 4,4 | \pm 2,6 |

dp=desvio padrão.

Tabela 3 - Influência da idade nos parâmetros seminais

| Parâmetros seminais | n | % total | Média de idade | dp | p |
|-----------------------------|-----|---------|----------------|------------|-------|
| Volume (n=523) | | | | | |
| Hipoespermia | 96 | 18,4 | 39,6 | \pm 10,3 | 0,001 |
| Normoespermia | 385 | 73,6 | 36,5 | \pm 7,3 | - |
| Hiperespermia | 42 | 8 | 36 | \pm 6,4 | 0,674 |
| Concentração (n=528) | | | | | |
| Azoospermia | 20 | 3,8 | 40,2 | \pm 9,4 | 0,063 |
| Oligoespermia | 156 | 29,5 | 37,3 | \pm 7,8 | 0,557 |
| Normoespermia | 324 | 61,4 | 36,8 | \pm 7,9 | - |
| Poliespermia | 28 | 5,3 | 35,7 | \pm 8,4 | 0,478 |
| Motilidade (n=512) | | | | | |
| Normal | 237 | 46,2 | 36,4 | \pm 6,9 | - |
| Astenospermia | 275 | 53,8 | 37,4 | \pm 8,6 | 0,171 |
| Morfologia (n=386) | | | | | |
| Normal | 139 | 36 | 36,7 | \pm 8,8 | - |
| Teratospermia | 247 | 64 | 37,3 | \pm 7,9 | 0,518 |

Morfologia segundo critérios de Krüger et al.¹¹; motilidade A+B (critério OMS)¹⁰; dp=desvio padrão; p<0,05.

O estudo da concentração espermática revelou normospermia em 61,4% das amostras, azoospermia em 3,8%, oligospermia em 29,5% e poliespermia em 5,3%. Os indivíduos azoospermicos apresentaram idade mais elevada que os demais, mas a comparação das idades médias dos grupos não revelou diferença significativa (Tabela 3).

A soma dos espermatozoides com motilidade progressiva (tipos A+B) foi normal em 46,2% das amostras avaliadas. A comparação das médias de idade dos grupos com motilidade normal e alterada não revelou diferença significativa (Tabela 3).

A morfologia, conforme os critérios de Krüger et al.¹¹, foi normal em apenas 36% das amostras estudadas. As médias de idade dos indivíduos com morfologia normal e alterada foram semelhantes (Tabela 3).

Discussão

O entendimento do efeito da idade sobre o potencial reprodutivo do homem sempre despertou a curiosidade dos estudiosos. A idade da paternidade tem sido uma preocupação constante devido à tendência mundial – mais observada nos países ocidentais – de os homens se tornarem pais cada vez mais velhos³.

Os mecanismos de influência da idade sobre o potencial reprodutivo da mulher são bem conhecidos³. Limitação do número de folículos primordiais e alterações na foliologênese são os principais mecanismos responsáveis pela redução da fertilidade e pela elevação das taxas de aborto espontâneo – que é observado frequentemente com a elevação da idade materna³.

Entre os homens, a espermatogênese é um processo contínuo, e a interferência da idade na capacidade reprodutiva já não é tão marcante⁶. Embora sejam descritas algumas modificações histológicas no aparelho reprodutivo, muitas vezes focalmente localizadas e com variações individuais, elas não estabelecem padrões de alterações espermáticas regularmente observadas⁶.

Recente revisão sobre a função reprodutiva e a idade do homem concluiu que a morfologia testicular e as características seminais sofrem deterioração diretamente proporcional à idade. Doenças crônicas, uso de medicações, exposição a agentes ambientais, produtos tóxicos, radiação e metais são outros fatores que, ao longo da vida do homem, podem prejudicar a qualidade espermática, porém são de difícil mensuração⁶.

Os resultados gestacionais, taxa de gravidez e risco de aborto de casais inférteis também sofrem influência da idade do homem⁹. Em um estudo com mais de 17.000 casos de inseminação artificial, foram observados, com maior frequência, espermatozoides mortos e com alterações de estrutura do DNA em homens com mais de 35 anos⁹.

A redução do volume seminal, do padrão de motilidade normal e do percentual de espermatozoides

morfologicamente normais é parâmetro espermático que, aparentemente, sofre maior influência com o avanço na idade masculina. A redução na concentração espermática parece ser um achado pouco frequente entre os principais estudos envolvendo essa problemática⁶.

Uma análise de 20 publicações, entre os anos de 1982 e 2003, nas quais se avaliaram as alterações espermáticas em relação à idade, revelou que somente em seis delas houve uma redução significativa no volume da amostra de sêmen entre os indivíduos mais velhos^{7,8,12-15}. Essa diminuição no volume foi observada, principalmente, quando não existiam diferenças no período de abstinência entre os grupos^{7,8,13,15}, sendo, em média, de 0,5%¹³ ou 0,03 mL⁷ ao ano.

A diminuição do percentual de espermatozoides móveis, observada em 12 das 20 publicações^{7,12,13,15-23}, foi mais frequente, sendo mais evidente quando houve controle no período de abstinência. A média de redução da motilidade anual variou de 0,3¹³ a 0,7%⁷. A redução da morfologia normal foi significativamente menor somente em quatro publicações^{13,18,20,23}. A média de redução da morfologia anual variou de 0,2¹³ a 0,9%¹⁸.

Os dados referentes à influência da idade do homem na concentração espermática são contraditórios: alguns autores descrevem uma tendência de redução^{19,20}, enquanto outros observaram uma elevação na concentração^{13,16,24}. Na presente análise, não houve interferência da idade na concentração espermática entre os diferentes grupos, porém os indivíduos azoospermicos, apesar de não significante, apresentaram uma idade mais elevada, resultado semelhante ao de outros autores^{8,17,18,21}.

A literatura oferece um número limitado de trabalhos metodologicamente corretos. Diferentes populações (homens inférteis, doadores de sêmen, voluntários), diferentes períodos de abstinência, presença de doenças crônicas e uso de medicações são algumas das variáveis que prejudicam uma melhor análise das referências publicadas.

A população do trabalho em questão foi formada por homens que apresentavam história de infertilidade conjugal, devido a fator masculino ou não. Porém, a comparação foi realizada entre a média de idade do grupo normal com os grupos com alterações em cada um dos parâmetros seminais avaliados conforme orientações da OMS. Entre os grupos estudados, o período de abstinência foi semelhante.

Na população em estudo, não foram excluídos os casos com antecedente de doenças crônicas, uso de medicações ou outros fatores que pudessem interferir na qualidade seminal. Porém, os resultados encontrados foram similares a estudos da literatura com metodologia semelhante.

Nos indivíduos estudados, a idade média foi mais elevada no grupo com redução do volume espermático, estatisticamente significativa. Entre os azoospermicos, a idade média foi ligeiramente mais elevada, estatisticamente não significativa.

Referências

1. Boivin J, Bunting L, Collins JA, Nygren KG. International estimates of infertility prevalence and treatment-seeking: potential need and demand for infertility medical care. *Hum Reprod.* 2007;22(6):1506-12.
2. Klein J, Sauer MV. Assessing fertility in women of advanced reproductive age. *Am J Obstet Gynecol.* 2001;185(3):758-70.
3. Baird DT, Collins J, Egozcue J, Evers LH, Gianaroli L, Leridon H, et al. Fertility and ageing. *Hum Reprod Update.* 2005;11(3):261-76.
4. Joffe M, Li Z. Male and female factors in fertility. *Am J Epidemiol.* 1994;140(10):921-9.
5. Ford WC, North K, Taylor H, Farrow A, Hull MG, Golding J. Increasing paternal age is associated with delayed conception in a large population of fertile couples: evidence for declining fecundity in older men. The ALSPAC Study Team (Avon Longitudinal Study of Pregnancy and Childhood). *Hum Reprod.* 2000;15(8):1703-8.
6. Kühnert B, Nieschlag E. Reproductive functions of the ageing male. *Hum Reprod Update.* 2004;10(4):327-39.
7. Eskenazi B, Wyrobek AJ, Slotter E, Kidd SA, Moore L, Young S, et al. The association of age and semen quality in healthy men. *Hum Reprod.* 2003;18(2):447-54.
8. Rolf C, Kenkel S, Nieschlag E. Age-related disease pattern in infertile men: increasing incidence of infections in older patients. *Andrologia.* 2002;34(4):209-17.
9. Belloc S, Cohen-Bacrie P, Benkhalifa M, Cohen-Bacrie M, De Mouzon J, Hazout A, et al. Effect of maternal and paternal age on pregnancy and miscarriage rates after intrauterine insemination. *Reprod Biomed Online.* 2008;17(3):392-7.
10. World Health Organization. WHO laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction. 4th ed. Cambridge: University Press; 1999.
11. Krüger TF, Menkveld R, Stander FS, Lombard CJ, Van der Merwe JP, van Zyl JA, et al. Sperm morphologic features as a prognostic factor in in vitro fertilization. *Fertil Steril.* 1986;46(6):1118-23.
12. Homonnai ZT, Fainman N, David MP, Paz GF. Semen quality and sex hormone pattern of 29 middle aged men. *Andrologia.* 1982;14(2):164-70.
13. Andolz P, Bielsa MA, Vila J. Evolution of semen quality in North-eastern Spain: a study in 22,759 infertile men over a 36 year period. *Hum Reprod.* 1999;14(3):731-5.
14. Spandorfer SD, Avrech OM, Colombero LT, Palermo GD, Rosenwaks Z. Effect of parental age on fertilization and pregnancy characteristics in couples treated by intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod.* 1998;13(2):334-8.
15. Rolf C, Behre HM, Nieschlag E. Reproductive parameters of older compared to younger men of infertile couples. *Int J Androl.* 1996;19(3):135-42.
16. Nieschlag E, Lammers U, Freischem CW, Langer K, Wickings EJ. Reproductive functions in young fathers and grandfathers. *J Clin Endocrinol Metab.* 1982;55(4):676-81.
17. Wang C, Chan SY, Leung A, Ng RP, Ng M, Tang LC, et al. Cross-sectional study of semen parameters in a large group of normal Chinese men. *Int J Androl.* 1985;8(4):257-74.
18. Schwartz D, Mayaux MJ, Spira A, Moscato ML, Jouannet P, Czyglik F, et al. Semen characteristics as a function of age in 833 fertile men. *Fertil Steril.* 1983;39(4):530-5.
19. Haidl G, Jung A, Schill WB. Ageing and sperm function. *Hum Reprod.* 1996;11(3):558-60.
20. Auger J, Kunstmann JM, Czyglik F, Jouannet P. Decline in semen quality among fertile men in Paris during the past 20 years. *N Engl J Med.* 1995;332(5):281-5.
21. Fisch H, Goluboff ET, Olson JH, Feldshuh J, Broder SJ, Barad DH. Semen analyses in 1,283 men from the United States over a 25-year period: no decline in quality. *Fertil Steril.* 1996;65(5):1009-14.
22. Henkel R, Bittner J, Weber R, Hüther F, Miska W. Relevance of zinc in human sperm flagella and its relation to motility. *Fertil Steril.* 1999;71(6):1138-43.
23. Mladenović I, Mičić S, Papić N, Genbacev O, Marinković B. Sperm morphology and motility in different age populations. *Arch Androl.* 1994;32(3):197-205.
24. Irvine S, Cawood E, Richardson D, MacDonald E, Aitken J. Evidence of deteriorating semen quality in United Kingdom: birth cohort study in 577 men in Scotland over 11 years. *BMJ.* 1996;312(7029):467-71.